

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Microbiología I



**TESIS DOCTORAL**

**Perfil clínico de los pacientes alérgicos al hámster Siberiano  
(Phodopus sungorus) e identificación de sus alérgenos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**José Alberto Torres Hernández**

**Directores**

**Joaquín Sastre Domínguez  
Carlos Pastor Vargas**

**Madrid, 2018**



**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I  
INMUNOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**“Perfil clínico de los pacientes alérgicos al hámster Siberiano  
(*Phodopus sungorus*) e identificación de sus alérgenos”**

**Memoria para optar al Grado de Doctor presentado por:**

***José Alberto Torres Hernández***

Directores de Tesis:

**Dr. Joaquín Sastre Domínguez**

**Dr. Carlos Pastor Vargas**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (IIS)  
HOSPITAL UNIVERSITARIO FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (IDC)**





Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Sanitarias (IIS)-Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (IDC), en el Servicio de Alergología y en el Laboratorio de Proteómica y Alergia del Departamento de Inmunología, bajo la dirección del Dr. Joaquín Sastre Domínguez y del Dr. Carlos Pastor Vargas, con la ayuda de una beca concedida por el Laboratorio MERCK-Allergopharma.



***”No es sabio el que sabe dónde está el tesoro, sino el que trabaja y lo saca”***

***Francisco de Quevedo y Villegas***



***A mis hijos Alvaro y Jorge***

***A mi esposa Lissette***

***A mis padres José Alberto y Amelia***

***A mis hermanos Pablo Antonio y Miguel Angel***



## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Joaquín Sastre Domínguez** y al **Dr. Carlos Pastor Vargas**: por todo el interés, enseñanzas, correcciones, paciencia y, sobre todo, por su valioso tiempo dedicado en la sabia dirección de este trabajo. ¡Gracias mil!

Al **Dr. Manuel de las Heras Gozalo**: por haberme entusiasmado, orientado y propuesto estudiar este tema hace ya unos años. Por su amistad y pasión común por el Real Madrid.

Al **Dr. Fernando Vivanco**: por haberme permitido desarrollar nuestro trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Inmuno-Alergia y Proteómica que dirige.

A la **Técnico Aroa Sanz Maroto**: por su colaboración en varios experimentos del estudio y su ayuda diaria en las labores propias del laboratorio.

Al **Dr. Jenaro Hernández**, los delegados **Eva Hernán París**, **Javier Calderón** y al **Laboratorio MERCK-Allergopharma** quienes confiaron desde un principio en este proyecto, contribuyendo generosamente, mediante la beca concedida que nos permitió desarrollar este proyecto.

Al **Dr. Miguel Ángel Arévalo** y al **Laboratorio Biomedal** por la excelente y valiosa contribución en la parte molecular de este estudio.

A la **Dra. Victoria del Pozo**, la **Dra. María de la Paz** y la **técnico Verónica Serrano Sanz**: por haber contribuido en algún experimento de este estudio.

Al **personal de enfermería, técnico auxiliar y secretarías del Servicio de Alergia**: **Adelaida**, **Margarita**, **Julia**, **Manoli**, **Erika**, **Rosa** y **Nieves**: por vuestro gran compañerismo, amistad y por haber colaborado de forma valiosa también en este trabajo y en mi formación como Especialista en Alergología. Gracias de corazón, sois las mejores!!!.

Al **personal Veterinario y auxiliar del Estabulario**: por colaborar desinteresadamente, encargándose del correcto cuidado de los hámsteres del estudio, y habernos proporcionado las fuentes con las que trabajamos las veces que así lo requerimos.

Al resto de **mis compañeros del Servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz**: **Dr. Javier Cuesta Herranz**, **Dr. Manuel de las Heras**, **Dra. Mar Fernández Nieto**, **Dra. Elena Hernández García de la Barreda** y a quien fuera mi Tutor durante la Residencia, el **Dr. Santiago Quirce Gancedo**, que de alguna manera contribuyeron en este trabajo; por vuestra amistad incondicional y por todo lo que me habéis enseñado estos años. Nunca lo olvidaré y les estaré eternamente agradecido.

A **mis compañeros ex – Residentes y amigos del Servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz**: **Carmelo Escudero**, **Elena Hernández**, **Andrea Vereda**, **Mauro Madero**, **Alicia Enríquez**, **Esther Compés**, **Silvia Sánchez** y **Luis Manso**, con quienes tuve la suerte de compartir unos años maravillosos durante mi estancia como Residente en el Servicio de Alergología del Hospital de la Fundación Jiménez Díaz.

**José Alberto Torres Hernández**





## ABREVIATURAS

### A

ATM                      área transversal media.

### B

BR                        broncodilatadores de rescate.

### C

CVF                      capacidad vital forzada

cADN                    Complementary Desoxirribonucleic Acid (Acido Desoxirribonucleico complementario).

CAP-FEIA                CAP Fluoroenzymes immunoassay system (Sistema CAP de Inmunoensayo por fluoroenzimas)

### D

DPK                      kalicreína prostática canina

### E

ELISA                    Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

### F

FEV<sub>1</sub>                    volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

FeNO                    Fracción exhalada de Óxido Nítrico.

### L

LABA                    long acting bronchodilators (broncodilatadores de larga acción).

### M

mARN                    Messenger Ribonucleic Acid (Acido Ribonucleico mensajero).

miliQ                    agua desionizada o desmineralizada.

MALDI-TOF             Matrix-assisted desorption/ionization spectrometry, Time-of-flight mass Spectrometry (Espectrometría de masas asistida por Desorción/ionización (Espectrometría de masas en tiempo de vuelo).

MS/MS                   Tandem mass spectrometry (espectrometría de masas en tándem).

MUP                      proteína urinaria de ratón.

### N

NO                        Nitric oxide (Óxido Nítrico).

### O

OBP                        Odorant-binding protein (proteínas de unión a odoríferos).

### P

PAGE                    Poliacrilamide electrophoresis gel (electroforesis en gel de poliacrilamida).

PGD<sub>2</sub>                    prostaglandina D subclase 2.

PEF                        Peak expiratory flow (pico flujo espiratorio).

PBS                        Phosphate buffer saline (fosfato buffer salino).

PC<sub>20</sub>                      concentración de provocación.

<b>R</b>	
RA	Rinometría Acústica.
RNA	Ribonucleic Acid.
RAST	Radio allergeabsorbent test (Test de radio-alergoabsorción).
<b>S</b>	
SDS	Dodecil sulphate sodic (Dodecil sulfato sódico).
<b>T</b>	
TH <sub>2</sub>	linfocitos T helper 2 (linfocitos colaboradores subtipo 2).
<b>V</b>	
VEG	glándulas de von Ebner.
VEF <sub>1</sub>	volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
VEF <sub>1</sub> /CVF	cociente respiratorio o Índice de Tiffeneau.
<b>W</b>	
	w/v weight/volume (peso/volumen).

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTO</b>	7
<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>SUMMARY</b>	15
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Prevalencia de Alergia a animales omésticosmascotas)	23
1.2. Exposición a animales: sensibilización, clínica y diagnóstico	25
1.3. Grupos de alta exposición	26
1.4. Propiedades aerodinámicas e importancia de las partículas suspendidas en el Interior	28
1.5. Alergia a roedores	30
1.5.1. Exposición a roedores dentro de los hogares	32
1.5.2. Alérgenos de los roedores	34
1.5.2.1. Estructura química y función de la Familia de las lipocalinas	35
1.5.2.2. Las lipocalinas como alérgenos	37
1.5.2.3. Las albúminas como alérgenos de reactividad cruzada entre mamíferos	39
1.6. Los hámsteres	40
1.6.1. Generalidades	40
1.6.2. Clasificación taxonómica	40
1.6.2. Género <i>Phodopus</i>	40
1.6.2.1. hámster enano Ruso o Siberiano o de Dzungaria	41
1.7. Estudios publicados de Alergia a los hámsteres	42
<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b>	
2.1. Objetivo general	49
2.2. Objetivos específicos	49
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1. Diseño del estudio	53
3.2. Población de estudio	53
3.2.1. Criterios de inclusión	53
3.2.2. Criterios de exclusión	53
3.3. Aspectos éticos del estudio	54
3.3.1. Consentimiento informado	54
3.3.2. Confidencialidad de los datos	54
3.3.3. Obtención y conservación de muestras biológicas	54
3.3.4. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica	55
3.4. Animales de experimentación	55
3.5. Obtención y preparación de extractos	55
3.6. Cuestionario clínico-epidemiológico	56
3.7. Estudios “in vivo”	57
3.7.1. Determinación de la Fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO)	57
3.7.2. Espirometría basal	57
3.7.3. Pruebas cutáneas	57
3.7.4. Determinación de IgE específica	58
3.7.5 Revisión de los pacientes incluidos en el estudio	58

3.8. Pruebas de provocación.....	59
3.8.1. Provocación nasal específica .....	59
3.8.2. Provocación bronquial específica .....	60
3.8.3. Test de exposición controlada .....	62
3.9. Análisis estadístico.....	64
3.10. Estudios inmunológicos “ <i>in vitro</i> ” .....	65
3.10.1. Listado de soluciones buffer o tampones .....	65
3.10.2. Cuantificación de proteínas .....	65
3.10.3. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	66
3.10.4. Preparación de pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano .....	66
3.10.5. Ensayos de inmunodetección.....	66
3.10.5.1. Ensayo de inmunodetección con filtro de Air Sentinel.....	67
3.10.6. Ensayos de reactividad cruzada mediante técnicas de inhibición (Immunoblot-inhibición) .....	67
3.11. Estudios de Proteómica .....	67
3.11.1. Identificación de proteínas alergénicas mediante espectrometría de masas .....	67
3.11.2. Clonación, purificación y expresión del alérgeno del hámster Siberiano.....	68
3.12. Estudios inmunológicos “ <i>in vitro</i> ” con la proteína recombinante de hámster Siberiano.....	74
3.12.1. Ensayos de inmunodetección mediante técnica de inmunoensayo ELISA .....	74
3.12.2. Ensayos de medicante técnica de inhibición mediante técnica de inmunoensayo ELISA .....	74
3.12.3. Test de activación de basófilos (Basotest®) .....	75

## RESULTADOS

4.1. Estudios “ <i>in vivo</i> ” .....	79
4.1.1. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos.....	79
4.1.2. Características clínicas de los pacientes incluidos .....	80
4.1.2.1. Pruebas funcionales respiratorias.....	80
4.1.2.2. Síntomas y pruebas cutáneas generales.....	81
4.1.2.3. Análisis estadístico entre número de sensibilizaciones y Tiempo de latencia .....	83
4.1.2.4. Síntomas tras exposición a hámster Siberiano .....	82
4.1.2.5. Tiempo de latencia .....	83
4.1.2.6. Análisis estadístico entre Tiempo de latencia y probabilidad de síntomas.....	83
4.1.2.7. Síntomas por exposición previa a otros animales .....	84
4.1.2.8. Pruebas cutáneas con extractos de hámsteres .....	85
4.1.2.9. Determinación de IgE específica .....	87
4.2. Pruebas de provocación específicas.....	88
4.2.1. Provocación nasal específica (PNE).....	88
4.2.2. Provocación bronquial específica (PBE).....	90
4.2.3. Test de exposición controlada con hámsteres Siberianos .....	93
4.3. Revisión a los 6 meses .....	107
4.3.1. Determinación de Fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) y espirometría .....	107
4.3.2. Análisis estadístico de pruebas funcionales respiratorias.....	109
4.3.3. Pruebas cutáneas .....	110
4.3.4. Tiempo de mejoría .....	111
4.3.5. Análisis estadístico Tiempo de latencia Vs Tiempo de mejoría.....	113
4.4. Visitas a Urgencias .....	113
4.5. Estudios “ <i>in vitro</i> ” .....	115
4.5.1. Cuantificación de proteínas de extractos alergénicos.....	116

4.5.2. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	117
4.5.3. Ensayos de inmunodetección mediante Western blot .....	118
4.5.4. Ensayos de Reactividad cruzada mediante Western blot-inhibición .....	119
4.5.4.1. Ensayos de inhibición de las las fuentes alérgicas de hámster Siberiano .....	119
4.5.4.2. Ensayo de inhibición con otras especies de roedores .....	120
4.5.4.3. Ensayo de inhibición con otras especies de hámsteres .....	120
4.6. Estudios de Proteómica .....	121
4.6.1. Identificación de proteínas alérgicas mediante técnica de espectrometría de masas .....	121
4.6.2. Clonación, purificación y expresión de la proteína alérgica identificada...	122
4.7. Estudios “ <i>in vitro</i> ” con la proteína recombinante de hámster Siberiano .....	129
4.7.1. Ensayos de inmunodetección mediante Western blot .....	129
4.7.2. Ensayos SDS-PAGE e inmunodetección con suero de paciente de Test de exposición controlada mediante Western blot.....	131
4.7.3. Ensayos de Reactividad cruzada entre la proteína recombinante de hámster Siberiano y otras proteínas nativas de especies de hámsteres incluidas .....	132
4.7.4. Ensayos de Reactividad cruzada entre hámster Siberiano y hámster Roborowski frente a proteína recombinante de hámster Siberiano.....	132
4.7.5. Ensayo de inmunodetección con extracto nativo de glándulas salivales y proteína recombinante de hámster Siberiano mediante ELISA .....	133
4.7.6. Ensayo de Reactividad cruzada entre proteína recombinante de hámster Siberiano y otras especies de hámsteres incluídas mediante ELISA.....	134
4.7.7. Test de activación de basófilos (Basotest®) .....	135

## DISCUSIÓN

5.1. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano.....	139
5.2. Caracterización de los alérgenos del hámster Siberiano ( <i>Phodopus sungorus</i> ) .....	143

<b>CONCLUSIONES</b> .....	149
---------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	153
---------------------------	-----

<b>ANEXO 1</b> .....	167
<b>ANEXO 2</b> .....	169
<b>ANEXO 3</b> .....	171
<b>ANEXO 4</b> .....	173
<b>ANEXO 5</b> .....	175
<b>ANEXO 6</b> Artículos publicados relacionados con Alergia al hámster Siberiano .....	177



**“Clinical profile of patients allergic to Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) and study of its allergens”.**

## **SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

For many years, it is well known that daily exposure to domestic animals or pets, especially in the urban environment, can lead to people sensitize to their allergens and to subsequently develop allergic symptoms, in case of not taking appropriate preventive measures.

The most frequent cases of allergy to pets are cats, and, secondly, dogs. The incidence of allergy to other pets is not known, since there are only descriptions of isolated cases, or small series, although the number of scientific publications has increased markedly in the last years.

In recent years a large number of Spanish homes has opted to have exotic pets within households and the number has been increased significantly, this as well, because most of them occupy less space within households and are for convenience in handling, in addition to the snobbery that involves for example, have a tarantula, a chinchilla or any rodent inside the house.

The list of exotic pets every day expands more and within this the hamsters are included. Hamsters are small omnivorous rodents that have originally lived in the wild, in the whole of Eastern Europe and Asia. One of the most popular hamsters is the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). The species Siberian, Russian or Dzungarian hamster, has gained great popularity with the introduction as a pet in Spanish households. It is a species of hamster small and docile, favoring their care and handling, being the most suitable species, especially for children.

The increasing introduction of this type of hamster in Spanish households has meant striking consultations increased in the outpatient clinics of Allergy, Pediatrics and Primary care. Many patients have been developed allergic symptoms that previously did not have or many patients allergic to other pets such as dogs or cats develop new symptoms to this new allergenic source within their homes.

Currently there are few published studies describing in detail the symptoms to exposure to this rodent can be produced in the exposed population. And likewise today there are not commercial extracts to make a correct diagnosis, due also the culprit allergenic protein responsible for the symptoms is unknown.

### **OBJECTIVES**

The aim of this study was to investigate the epidemiological and clinical characteristics of patients who developed allergic symptoms by exposure to Siberian hamster (Sh) inside their homes, and at the same time the characterization and cloning of the Siberian hamster allergen. Its allergenicity and cross-reactivity knowledge could improve the specific diagnosis and treatment for patients allergic to Sh.



## MATERIAL AND METHODS

Patients from the outpatient clinic of the Allergy Department of the IIS-Hospital Fundación Jiménez Díaz who had presented allergy symptoms by exposure to Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) inside their homes were recruited.

In order to realize a comparative study between other hamster species, several hamsters from 4 different species (Siberian, European, golden and Roborovski) were purchased in a local pet shop. Animal handling were observed in optimal conditions according European guidelines for experimental animals. Extracts were derived from the hair, urine and salivary glands of each species. All extracts were homogenized after centrifugation, dialysis, and further lyophilization. Total protein content was determined by the Coomassie Plus (Bradford®) assay.

Skin prick test (SPT) with different hamster extracts and common allergens battery including animal allergens from cat, dog, and, horse were performed according to European Academy of Allergy and Clinical Immunology guidelines. Specific IgE antibodies to animal allergens were determined using the CAP System (Uppsala, Sweden). Five non-atopic patients were used as controls.

Clinical tests such as spirometry and Nitric Oxide exhaled fraction determination were realized and compared in each patient at the moment of the inclusion and six month later once hamsters were removed from patient's houses.

Two specific nasal and bronchial challenges with Sh epithelium extract were performed in some patients that experimented rhinoconjunctival and asthma symptoms respectively due to Sh exposure within their houses. Specific nasal challenges were determined by means of Acoustic Rhinometry (RA) measures of the minimal transversal area (ATM) and nasal symptoms were registered using an analogical score. Specific bronchial challenges included an induced sputum analysis that it was performed after the challenge. Bronchial cells were suspended in saline solution and stained using Papanicolau and Giemsa methods and then they were counted by flow cytometry.

An Exposure challenge inside a 7m<sup>3</sup> inhalative provocation chamber was performed in a patient who have had both rhinoconjunctival and asthma symptoms. Metacholine test were performed at baseline and 24 hours after exposure. Measures of the FEV1 were recorded hourly one day before and one day after challenge, using a portable device AMOS Jaeger®. An automatic Air Sentinel filter (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota) was placed inside the chamber. The polytetrafluoroethylene membranes were processed by elution to subsequently perform an immunodetection of extract with the patient sera. A nasal cytology was realized previous and after Exposure challenge.

SDS-PAGE, Immunoblot analysis, and inhibition assays were carried out. Polyacrylamide concentration of 14% (w/v) and 5% (w/v) were used for separating and stacking gels, respectively. Protein was applied at 50 µg/lane. To ensure proper protein separation and visualization, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (Sigma). Membranes were blocked and then incubed overnight at 4°C with the patient sera. To perform immunoblot inhibition assays, the serum pool was incubated with 100 µg/ml hamster extracts.

The proteins were identified by mass spectrometry and/or MS/MS. Total RNA was extracted from submaxillary glands using the PureLink RNA mini kit (Invitrogen). cDNA was

obtained using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNA was amplified using Taq polymerase (Biomedal) and specific primers whose design was based on the published N-terminal amino acid sequence. The PCR amplification product was cloned into pBluescript SK<sup>+</sup> for sequence analysis. The excised allergen gene was cloned into the expression vector T7/Cascade pMAB36 (Biomedal) using primers obtained for the open reading frame coding of the mature protein.

cDNA coding for the sequence was expressed in *E. coli* cells as recombinant protein with a C-terminal hexahistidine tag. The expressed protein was purified by metal chelate affinity using HIS-select nickel affinity gel. Fractions containing recombinant allergen were pooled, dialyzed against ammonium bicarbonate, lyophilized, and resuspended at 1 mg /ml. The purity of the recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE, and identity was confirmed by mass spectrometry.

Immunoblot assays with the recombinant protein were performed as described with the native extracts. The serum pool was incubated with 50 µg/ml recombinant protein to perform inhibition assays.

ELISA assays were realized with 96-well flat plates that were coated in duplicate overnight at 4°C with 20 µg Siberian hamster salivary glands extract or 0.5 µg of the recombinant protein.

In order to demonstrate “*in vivo*” activity of the recombinant protein obtained a basophil activation test was performed with the BasoFlowEx test kit (Exbio). Evaluation of basophil degranulation was performed by flow cytometry following the manufacture’s directions. A non-atopic patient was used as negative control.

## RESULTS

Twenty-one patients allergic to Sh were recruited from the outpatient clinic from Instituto de Investigaciones Sanitarias (IIS) - Hospital Fundación Jiménez Díaz. Of the 21 patients, 14 (66.7%) were female and 7 (33.3%) were male. The female-ratio found was 2:1, data similar to other publishes series. The overall age of patients included was 27,2years (±10-46). This aspect shows that most patients who suffer allergic symptoms due to Sh exposure were children and young adults, which continues to being an important morbidity problem.

In our series, most of the patients studied (71.4%) developed asthma symptoms. A group only rhinoconjunctivitis (23.8%) and only 1 patient presented an anaphylaxis reaction after Sh bite, which has been described in a few publications. There were no patients with contact urticaria symptoms as it has been published by other authors.

Nine of the patients allergic to Sh (42.8%) studied had pollen allergy symptoms. This fact shows the degree of atopy presented by our series.

Most of the patients studied (71%) presented a time of exposure between 4-12 weeks. This seems to indicate that Sh allergens have a major sensitizing power and it is deduced that in a shorter time more likely to have clinical symptoms.

We noted that 18 of the 21 patients studied (85.7%) had had allergic symptoms by previous exposure to other animals as this home; according to other studies, be allergic to animal previously is a risk factor for developing occupational allergy. Despite the fact that this aspect has not been reflected in any study with pet allergy within households,

according to our results we can affirm that have a previous animal allergy can be a risk for develop allergic symptoms due to Sh exposure inside homes.

SPT revealed that 11 patients were monosensitized to Sh while seven, also had awareness Roborowski hamster (Rh) sensitization. This is important because it reflects that although patients at the time of inclusion only had been exposed to Sh exclusively a high positivity in the SPT with Rh could result in a possible cross-reactivity between both species. SPT performed with five non-atopic patients were negative.

Specific nasal and bronchial challenges as well as Exposure challenge tests performed demonstrated the ability of the Sh allergen to induce clinical symptoms and an obstructive and inflammatory response in the epithelium of the nasal and bronchial mucosa respectively.

Three IgE-binding bands of about 18, 21 and 23 kDa respectively were detected and recognized by immunodetection assay, which subsequently were identified by mass spectrometry. These bands were identified in hair, salivary glands, and urine extracts from Sh. All bands corresponded to the same protein, which was identified as a lipocalin. This lipocalin had no cross-reactivity with common or European and golden hamsters.

The immunoblot inhibition assays demonstrated no cross-reactivity between Sh and golden and European hamsters. However, there was a partial inhibition between extracts from Sh and Rh, showing a possible cross-reactivity. No cross-reactivity was shown between Sh and other rodents and animals such as gerbil, Guinea pig and rabbit.

A recombinant protein was obtained from the amino acid sequence revealed by mass spectrometry. Recombinant protein was expressed in *E. coli* and two bands were observed by both SDS-PAGE and immunoblot assay at 21 and 23 kDa, analysed by MS/MS, and identified as **rPho s 21 kDa**. The amino acid sequence of it was aligned and compared with similar mammalian proteins present in protein databases. The rPho s 21 kDa was clearly assigned to the lipocalin protein family and specifically to the odorant-binding protein and aphrodisin-like proteins. The lipocalin protein signature GXW was found in positions 8-10 of rPho s 21 kDa.

ELISA experiments confirmed a high correlation between the levels of specific IgE to Sh salivary glands extract and rPho s 21 kDa, suggesting that rPhos s 21 kDa could be an efficient tool in *in vitro* tests to diagnose Sh allergy. IgE ELISA-inhibition assay resulted in no inhibition of IgE binding with golden and European hamsters, demonstrating no cross-reactivity with these hamsters. Using Sh salivary glands extract, there was a partial inhibition between rPho s 21 kDa and Rh extract, showing possible cross-reactivity phenomena.

The basophil activation test with rPho s and Sh salivary gland extract demonstrated the biological activity, confirming that specific IgE is able to elicit basophil degranulation in patients who are allergic to Sh. No activation response was observed with blood from a non-atopic patient, used as negative control.

## CONCLUSIONS

Siberian hamster allergy is a disease of young people. Respiratory symptoms such as rhinoconjunctivitis and asthma are present in the majority of the patients. There is a risk of anaphylaxis in the case of bite. The three studied allergenic sources have the same capacity to volatilize and sensitize the patients inducing obstructive and inflammatory changes in the nasal and bronchial epithelium.

Three IgE-binding bands of about 18, 21 and 23 kDa respectively were identified in the three allergenic sources.

There is a partial cross-reactivity between species of Sh and Rh. However, there is not cross-reactivity demonstrated between Siberian hamster and European and Golden hamster and also other species of studied rodents.

The 18, 21 and 23 kDa IgE-binding bands have the same sequence of internal peptides, suggesting that the 23-kDa band is a single protein and the other two bands are internal degradation resulting isoforms. This protein is an "odorant-binding protein" that belongs to the superfamily of the lipocalin and was recognized by sera from patients.

This protein was cloned, purified, and expressed in *Escherichia coli* and was named as ***rPhos 21 kDa***. The recombinant allergen was tested by ELISA and immunoblotting showing a similar IgE-reactivity *in vitro* to Siberian hamster protein extracts. Also, the recombinant allergen was capable of producing biological activation "*in vivo*" by means of basophil activation test.

The identification, characterization and description of this new protein will provide us a new tool for specific diagnosis of allergy to Siberian hamster (*Phodopus sungorus*).



# ***INTRODUCCIÓN***



# INTRODUCCIÓN

## ***1.1. Prevalencia de Alergia a animales domésticos (mascotas).***

Desde hace muchos años es bien conocido que la exposición diaria a animales domésticos o mascotas, sobretudo en el medio urbano, puede conllevar a que las personas se sensibilicen a sus alérgenos y, posteriormente, puedan desarrollar síntomas alérgicos, en caso de no tomar las medidas preventivas adecuadas.

En España, por ejemplo, alrededor del 6% de la población general está sensibilizada a animales, pero esta cifra es mayor en las personas atópicas. Según el estudio *Alergológica 2005* realizado en 4.500 pacientes que acudieron a consultas de Alergología en diferentes ciudades españolas, un 26% de los asmáticos convivía con perros y un 15% con gatos; el 20% de ellos estaba sensibilizado a los animales; resultando ser la tercera causa de asma alérgica después de los pólenes y los ácaros del polvo<sup>1</sup>.

El mismo estudio, pero realizado en 1992, arrojaba una cifra de 15% en la prevalencia de los casos de asma originados por exposición a animales; por lo que comparando ambos estudios hechos con 13 años de diferencia, se ha comprobado un aumento significativo de este problema en poco más de una década<sup>2</sup>.

Los casos más frecuentes de alergia a mascotas corresponden a los gatos, y, en segundo lugar, a los perros. La incidencia de alergia a otras mascotas no se conoce, debido a que sólo hay descripciones de hechos aislados, o de pequeñas series, si bien el número de publicaciones científicas ha aumentado notablemente en los últimos años<sup>3</sup>.

En el estudio de prevalencia sobre sensibilización a los alérgenos de perro entre las personas con asma en Estados Unidos, se observó que entre un 34 y un 37% de las personas estaban sensibilizadas si los perros estaban presentes dentro de los hogares. De éstos, entre un 7,3 y 13,8% de las personas sensibilizadas a perro tenían asma<sup>4</sup>.

A pesar de que tanto gatos como perros son las mascotas tradicionales dentro de los hogares, y por tanto, las que con mayor frecuencia producen síntomas alérgicos en la población mundial, no es menos cierto que en los últimos años se ha visto un gran auge en la tenencia de animales exóticos dentro de los hogares. Por ejemplo datos obtenidos de los Servicios de Vida Animal Salvaje de los Estados Unidos revelan que aproximadamente 8 millones de animales exóticos, tales como: arácnidos, anfibios, peces, aves, reptiles y roedores, fueron importados por ejemplo, entre julio 2007 y junio 2008 hacia los Estados Unidos para fines comerciales y personales<sup>5</sup>.

Aunque faltan datos estadísticos, detallando el número total de hogares con mascotas exóticas o no tradicionales, sin duda, un porcentaje significativo está siendo vendido o adoptado desconociéndose el potencial alergénico que puede representar para aquellos individuos expuestos en sus hogares.

En el caso particular de los roedores, se ha comprobado que en el ámbito laboral del personal de tiendas de mascotas, clínicas veterinarias y laboratorios de investigación experimental, puede llegar a afectar entre el 11% y 44% del personal expuesto, siendo los alérgenos de roedores potentes agentes causales de síntomas tanto agudos como crónicos<sup>6</sup>. Se ha podido confirmar que en el ambiente laboral hasta un tercio de las personas expuestas a animales de



laboratorio desarrollan rinitis, conjuntivitis y urticaria de contacto, y que una de cada diez personas expuestas puede desarrollar asma ocupacional<sup>7</sup>.

Estudios epidemiológicos de NCICAS (National Cooperative Inner City Asthma Study) en hogares de los Estados Unidos, demuestran una presencia significativa de alérgenos de roedores en las viviendas, encontrándose una asociación entre nivel de exposición a ratón, sensibilización al alérgeno Mus m 1 y prevalencia y gravedad del asma en pacientes sensibilizados. La frecuencia de sensibilización en esta población a alérgenos de ratón por prueba cutánea es del 10 al 20%<sup>8</sup>.

Aunque los alérgenos de rata y ratón han sido los mayormente estudiados, cada día es más frecuente el empleo de cobayas, hurones, conejos y hámsteres, como mascotas dentro de los hogares.

Los hámsteres son pequeños roedores omnívoros que originalmente han vivido de forma silvestre, en toda la extensión geográfica de Europa del Este y Asia. Desde hace ya varios años, algunas de sus especies son comercializadas en tiendas de mascotas. Entre las más comunes podemos destacar: el hámster común o Europeo (*Cricetus cricetus*) y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Sin embargo, estas razas son particularmente agresivas entre sus congéneres y hacia las personas, por lo que su popularidad ha ido decayendo en las ventas comerciales en los últimos años. En cambio, la especie "*Phodopus sungorus*" (hámster Siberiano, Ruso o de Zungaria) ha cobrado una gran popularidad al introducirse como mascota dentro de los hogares españoles. Se trata de una especie de hámster más pequeña y dócil, favoreciendo su cuidado y manejo, siendo esta especie más adecuada, sobre todo para los niños.

Al no ser un roedor que se utilice habitualmente para experimentación en laboratorios, prácticamente la totalidad de las exposiciones se producen dentro de las viviendas y/o en el personal que trabaja en tiendas de mascotas.

En países como Japón, el hecho de ser el espacio tan reducido de las viviendas, que ha impedido que animales de mayor tradición, como perro y gato, puedan mantenerse adecuadamente, ha traído como consecuencia un incremento en la tenencia de este roedor como mascota<sup>7</sup>.

La creciente introducción de este tipo de hámster en los hogares españoles, ha significado un aumento llamativo de consultas en los Servicios de Alergología, de Pediatría y de Atención Primaria, debido al desarrollo de síntomas alérgicos en personas, que antes no tenían, y que se supone han podido desarrollar a partir de la introducción de esta mascota dentro de sus hogares.

Actualmente existen pocos estudios publicados que describan con detalle los síntomas que la exposición a este roedor puede llegar a producir en la población expuesta. Se desconocen cuáles son los alérgenos responsables de los síntomas y también, cuáles son los datos de prevalencia de la Alergia a este roedor dentro de los hogares españoles.

## ***1.2. Exposición a animales: sensibilización, clínica y diagnóstico.***

La exposición a mascotas ha recibido mucha atención como potencial factor de riesgo o de protección en el desarrollo de enfermedad alérgica. Diversas medidas de exposición (tiempo, duración y tipo) y resultados (medición de IgE, pruebas cutáneas y datos de síntomas) han sido investigados a través de estudios, y los resultados han sido dispares.<sup>9</sup>

Hay factores hereditarios que pueden contribuir a la predisposición de padecer una alergia a animales. Si existen antecedentes alérgicos en la familia, por ejemplo, si uno de los padres tiene alergia a un animal, el riesgo de desarrollo de alergia en sus niños es elevado. Y si es en ambos progenitores el riesgo de que el niño desarrolle alergia a los animales es más elevado.<sup>6</sup> Sin embargo, pocos estudios han podido examinar si persisten los efectos observados en los primeros años de vida más allá de la infancia<sup>9</sup>.

Peat y Li en un metanálisis integral, evaluaron varios factores ambientales responsables de la incidencia y severidad del asma. Concluyeron que la exposición de alérgenos interiores era el factor ambiental que, en mayor medida tenía un efecto más directo en cuanto a la manifestación de asma se refiere<sup>10</sup>.

Contrariamente a lo que se piensa, el pelo no es principal causante de la alergia a los animales, sino las partículas de caspa, que contienen los alérgenos formados en las secreciones de glándulas sebáceas y salivares. En los animales, al igual que en las personas, al ir renovándose la piel, se va desprendiendo poco a poco en forma de escamas microscópicas<sup>11</sup>.

Las secreciones que contienen los alérgenos quedan adheridas al pelo y a la capa córnea de la piel. Al descamarse se originan pequeñas partículas capaces de permanecer flotando en el aire durante largos períodos de tiempo y cuando son inhaladas, ocasionan síntomas alérgicos en nariz, ojos y vías respiratorias. Estas partículas caen lentamente y se depositan en el suelo o en el mobiliario; pero, ante pequeños movimientos, vuelven a suspenderse en el aire; motivo por el cual, los pacientes alérgicos a animales notan síntomas nada más entrar en lugares donde los hay aunque no estén presentes en ese momento. El pelo también puede causar alergia, pero con menos frecuencia ya que se deposita en el suelo y no permanece en el ambiente.

La orina es la principal fuente de alérgenos en roedores. Cuando se seca, queda adherida a las pequeñas partículas del polvo o del lecho de las jaulas, que se mantienen flotando y se distribuyen por el aire a zonas alejadas de la vivienda o de las instalaciones de animales donde se encuentran los roedores.

Factores asociados al animal o a su entorno, como la presencia de garrapatas y otros ectoparásitos suyos, los ácaros que se alimentan de la caspa del animal, los hongos que proliferan por la humedad que puede desarrollarse en la jaula por el depósito de orina, el uso de insecticidas y otros productos químicos para su cuidado, el propio alimento y material de cama utilizado en las jaulas de los animales que, en su gran mayoría está hecho a base de fuentes proteicas de origen animal.

La evaluación de los procesos alérgicos relacionados con exposición ambiental envuelve un número importante de elementos: una historia clínica consistente con la enfermedad respiratoria de la que sospechamos; en el caso de alergia a animales se debe preguntar por: tipo de animal, cantidad y antigüedad en la casa. Relacionar el inicio de los síntomas con la

llegada de éste al domicilio, sitio donde pasa la mayor parte del tiempo, si entran a la habitación donde duerme el paciente, si se suben a la cama, qué síntomas presentan con su exposición, etc. En el caso de roedores, es necesario preguntar si están sueltos o enjaulados, cantidad y material utilizado en el lecho de la jaula.

Es preciso saber si los síntomas se reproducen en otros ambientes donde pueda existir el agente sospechoso; por ejemplo, exposición a gatos en otros lugares, o si se suele estar en contacto con personas que trabajen con animales (veterinarios, empleados de tiendas de animales, estudiantes de biología etc.).

Las pruebas cutáneas y los tests serológicos para medición de IgE específica deben de ser realizadas en todos aquellos pacientes con síntomas altamente sospechosos de estar relacionados con la exposición animal.

Actualmente se comercializan extractos para pruebas cutáneas para la mayoría de animales domésticos, incluidos algunos roedores, los cuales son utilizados dentro de las baterías diagnósticas en las consultas de Alergología. Sin embargo, no existen extractos comerciales estandarizados para roedores como jerbo, chinchilla, ardilla y el propio hámster Siberiano. Esto dificulta el diagnóstico, lo que conlleva a que se tengan que preparar extractos caseros con las distintas fuentes alérgicas del animal sospechoso.

### ***1.3. Grupos de alta exposición: personal de laboratorio, empleados de tiendas de mascotas y veterinarios.***

La Alergia a animales constituye un gran problema sanitario que no sólo afecta a propietarios de mascotas, sino también al personal que se ocupa del cuidado de los mismos en los casos de laboratorios de investigación y trabajadores de tiendas de mascotas.

El trabajar con animales en un laboratorio es un factor de riesgo de enfermedad alérgica ocupacional bastante conocido. Usualmente, entre el 10% al 50% del personal de un laboratorio expuesto a roedores desarrollan sensibilización IgE específica a los alérgenos de estos animales, la mayoría dentro de los primeros 5 años de exposición. En los últimos tiempos, en distintos países industrializados, las autoridades sanitarias locales han realizado y exigen cumplir una serie de protocolos epidemiológicos para regular la práctica laboral en los laboratorios mediante evaluaciones periódicas de las instalaciones, exploración médica del personal y educación preventiva; además de tomar medidas con aquellos trabajadores que hubieran desarrollado síntomas alérgicos por exposición animal en su área de trabajo<sup>12</sup>.

La exposición ocupacional en el entorno de la tienda de mascotas engloba un buen número de fuentes de alérgenos, así como agentes microbianos, como por ejemplo las endotoxinas, que pueden inducir síntomas respiratorios ocupacionales, los cuales podrían influir en el riesgo de desarrollar en los trabajadores síntomas respiratorios, rinoconjuntivales e incluso cutáneos<sup>13</sup>. De igual forma existen unos pocos casos en los que las larvas de insectos quironómidos<sup>14</sup> y las larvas del gusano *Tenebrio molitor* (gusano de la harina)<sup>15</sup>, han demostrado ser causa de asma ocupacional y otros síntomas. También se ha informado de un caso de hipersensibilidad durante la inhalación y la ingestión accidental de larvas del gusano de la harina, como también del gusano *Zophobas morio*<sup>16</sup>. Incluso los reptiles pueden causar alergia dentro de tiendas de mascotas; el primer artículo que describe un caso de sensibilización a una Iguana fue publicado en 2000.<sup>17</sup> También se han publicado casos de alveolitis alérgica extrínseca por la exposición a pájaros<sup>18</sup>.

En el estudio publicado por el grupo sueco de Renström *et al* en 2011, se estudiaron 54 pacientes de 24 tiendas de animales distintas, realizándoseles un cuestionario, medición de función pulmonar y pruebas cutáneas (prick test) frente a un panel de alérgenos ambientales comunes y de animales domésticos. Los resultados de dicho estudio arrojaron que un 53% de los pacientes estudiados reportaron síntomas nasales, 34% síntomas oculares, y un 22% experimentó síntomas sugestivos de asma. Sin embargo, sólo 4 trabajadores (7%) habían sido diagnosticados de asma anteriormente. Un tercio de los pacientes presentaron síntomas respiratorios en el trabajo, sobre todo por exposición a roedores, aves, insectos y el heno utilizado en las jaulas de exposición de los animales<sup>13</sup>.

Sin embargo, otro estudio implicaba que los alérgenos de animales de laboratorio podrían distribuirse dentro de los hogares, como también en otras áreas de trabajo. Los niveles de alérgenos de rata y de ratón se encontraron significativamente en mayor cantidad en muestras de colchones y en los gorros del personal del que trabajaba con animales que en los sujetos control<sup>19</sup>.

En el estudio del grupo polaco de Krakowiak se estudiaron niños, hijos de padres trabajadores en laboratorios expuestos a animales, llegando a la conclusión de que la ocupación paterna es un factor de riesgo adicional para la sensibilización, debiendo ser tomado en cuenta al realizarse la historia clínica. Se confirmó que la atopia (mostrada por la positividad a las pruebas cutáneas a perro y gato también era otro factor de riesgo para la sensibilización a animales de laboratorio. Sin embargo, el nivel de IgE total medida a los pacientes no demostró ser factor predictor determinante de sensibilización hacia el epitelio de ratones, ratas y hámsteres, a los que estaban expuestos los padres trabajadores en laboratorios<sup>20</sup>.

Otro aspecto que también ha sido valorado en estudios con exposición a roedores es el sexo del animal. El riesgo de trabajar con animales machos frente a trabajar con animales hembras ha sido estudiado. Se ha podido demostrar que los machos excretan 100 veces más la cantidad de alérgenos (Mus m 1 de ratón y Rat n 1 de rata) encontrados en la orina que las hembras<sup>21</sup>.

En diversos estudios se ha descrito que en ratas adultas machos -a las que se le ha inducido una situación de hipotiroidismo-, la producción hepática de  $\alpha 2$  macroglobulina (lipocalinas) y la hormona de crecimiento, es mucho mayor que en las hembras, dando respuesta al estímulo de la hormona tiroidea y a los glucocorticoides<sup>22</sup>. De igual forma, Sakaguchi *et al* encontraron que los ratones machos producían un mayor nivel de alérgenos aerotransportados en un edificio, que los ratones hembras.<sup>23</sup>

En estudios realizados en alergia ocupacional es conocida que la presencia de niveles de IgG<sub>4</sub> es más común en aquellos sujetos con una exposición más prolongada al agente potencialmente sensibilizante<sup>24</sup>. En estos estudios, la presencia de IgG<sub>4</sub> no se asoció con síntomas de la alergia. Por lo tanto, fue considerado como un marcador de exposición. Un número de estudios han investigado la prevalencia de las enfermedades alérgicas entre los trabajadores expuestos ocupacionalmente a roedores en la industria farmacéutica, laboratorios universitarios o unidades de investigación (Renström *et al* 2001; Bush *et al*. 1998) pero hay informes aislados que estudian el desarrollo de las enfermedades alérgicas ocupacionales por exposición a roedores, látex de caucho natural y desinfectantes en los veterinarios (Lustky *et al.*, 1985)<sup>25</sup>.

Una encuesta de asma ocupacional basada en el registro finlandés de enfermedades profesionales, reveló que el 60% de todos los casos fueron causados por epitelios de animales, pelos, secreciones, harina, cereales y forrajes. Aparte de panaderos y pintores, los veterinarios tuvieron la mayor tasa de incidencia de reacciones alérgicas<sup>26</sup>.

El “National Institute for Occupational Safety and Health” (NIOSH 1998)” sugirió unos consejos sobre el control de la exposición a los alérgenos de animales; en particular, para aumentar la tasa de ventilación y humedad en el alojamiento a fin de disminuir la densidad de animales para mantener las jaulas de animales y manejo de áreas limpias así como la utilización de almohadillas absorbentes para ropa de cama de las jaulas.

La dermatitis alérgica, siendo a menudo una urticaria de contacto mediada por IgE por la exposición animal, se consideró un problema significativo en la práctica veterinaria. De 160 tipos de enfermedades profesionales verificadas, 26 (16,3%) fueron causadas por la dermatitis alérgica, y 54 (33,8%) fueron causadas por la dermatitis de contacto irritante primaria<sup>26</sup>.

#### ***1.4. Propiedades aerodinámicas e importancia de las partículas suspendidas en el interior.***

La medición de alérgenos de interior ha jugado un papel importante en la mayoría de los ensayos epidemiológicos, que investigan los factores de riesgo sobre sensibilización alérgica y posterior desarrollo de enfermedades alérgicas como la rinoconjuntivitis y el asma<sup>27</sup>.

Sin embargo, no deja de ser un problema importante en la investigación de los ambientes de interior, el que las partículas que llevan alérgenos no son identificables bajo el microscopio de luz, por lo que no hay ningún equivalente al conteo del polen<sup>28</sup>.

Los niveles de aeroalérgenos de animales son pequeños, entre 2-40 ng/m<sup>3</sup> <sup>29</sup>. Por tanto, la medición de la exposición a los alérgenos dentro de los hogares depende de inmunoensayos sensibles, los cuales también pueden jugar un papel importante en la estandarización de los extractos de alérgenos.

En 2004 el NSHL (National Survey of Lead and Allergens Housing) examinó la prevalencia de alérgenos de perros y gatos detectables en una muestra representativa, de todos los hogares, en muestras de polvo recogidas desde el sofá, cama o el piso de la sala de estar. En 831 hogares se registró que en las muestras recogidas, los alérgenos de perro (Can f 1) y de gato (Fel d 1) fueron constantes en presencia en más del 90% de todas las casas, aún en aquellas casas donde el 31% sólo tenía un perro y un 23,8% tenía un gato<sup>30</sup>.

Las casas de los asmáticos tenían una mayor carga alérgica y, entre los individuos alérgicos, una alta exposición a los alérgenos en la vivienda aumentó significativamente la probabilidad de tener síntomas de asma (odds ratio 1,81; IC 95% 1,04-3,15). Presumiblemente, la alta prevalencia con que los alérgenos de perro y gato fueron detectables fue como resultado de que los alérgenos del animal doméstico lo llevan en la ropa las personas que se mueven dentro de los hogares. Aún así existen grandes diferencias en la detección de niveles de Can f 1 y Fel d 1 en hogares con y sin mascotas. Arbes y cols. encontraron que los niveles de Fel d 1 fueron 100 veces mayor en los hogares con gatos, y que los niveles de Can f 1 eran 50 veces mayor en los hogares con perros.

Estudios han determinado que al menos el 15% de los alérgenos del gato son aerosolizados en partículas de menos de cinco micras. Esta característica permite que estas partículas permanezcan largos períodos de tiempo suspendidas en el aire doméstico. Además, estos alérgenos tienen la particularidad de adherirse a paredes, cortinas, sofás, alfombras etc. De hecho, en estudios realizados, después de la retirada del gato de una vivienda se ha podido comprobar que, tras recolecciones seriadas de material depositado sobre dichas superficies, aún hasta 6 meses después pueden encontrarse restos de alérgenos en la misma proporción que en viviendas donde no se ha retirado el gato. Esto da una idea de la ubicuidad de estos alérgenos, pudiéndose encontrar presentes en lugares donde nunca han estado presentes animales.

En un estudio realizado por Bollinger *et al* se encontró que aún en casas donde no había gatos, se encontraban niveles de alérgenos capaces de producir síntomas respiratorios en vías altas y bajas, implicando cambios en la función pulmonar<sup>31</sup>. Esto mismo ocurre también con la exposición accidental con alérgenos de perro. Y no es raro encontrarse pacientes que en el ambiente escolar desencadenen desde síntomas rinoconjuntivales hasta crisis de broncoespasmo<sup>32</sup>.

En el caso del perro, sus alérgenos se distribuyen de igual forma que los de gato, encontrándose hasta en 20% de las partículas suspendidas en el aire<sup>33</sup>.

Las partículas fecales de ácaros de la piel de perros o gatos y las partículas de polvo contaminadas por proteínas de la orina de roedores poseen distintas características. Tanto los alérgenos de ácaros del polvo y de cucarachas disminuyen rápidamente después de algún movimiento en el ambiente. Así, todas las mediciones de la exposición aeroambiental requieren un elemento de perturbación interna como por ejemplo: limpieza con aspiradora, hacer las camas, extender sábanas, despolvar etc.; y la concentración de alérgenos en el suelo o depósito de polvo proporciona una medición simple de exposición<sup>29</sup>.

En el caso de los laboratorios donde se manipulan roedores como animales de experimentación, muestras recogidas de alérgenos de rata y ratón demuestran que el personal que se encarga de la alimentación y la limpieza de las jaulas donde permanecen estabulados tiene un alto riesgo de exposición a estos alérgenos, con el consiguiente y posterior desarrollo de síntomas alérgicos.

El tamaño de partícula en el que pueden encontrarse los alérgenos de ratón puede oscilar entre 0,4 hasta 0,3  $\mu\text{m}$ , mientras que los de rata el tamaño es entre 1 hasta 20  $\mu\text{m}$ . Estos alérgenos pueden mantenerse suspendidos hasta sesenta minutos, después que haya habido movimientos de estos animales en el medio donde se encuentran y ser capaces de provocar síntomas<sup>34</sup>.

Los alérgenos de la orina de roedores son aerotransportados sobre partículas amorfas de polvo del lecho de los animales. Estas partículas tienen un rango de tamaño amplio, la mayoría son pequeñas y se dispersan con facilidad dentro de las instalaciones de animales, de forma que los trabajadores alérgicos pueden presentar síntomas en zonas donde no hay animales<sup>35</sup>.

Mediante técnicas de muestreo ambiental por absorción dinámica e impacto en cascada, se ha determinado que los alérgenos de animales, a diferencia de los pólenes, se transportan en una gran variedad de partículas amorfas<sup>36</sup>. El tamaño de la partícula dependerá de las condiciones

del muestreo, siendo de mayor tamaño si se realiza inmediatamente después de una situación de turbulencia<sup>35</sup>.

La deposición de partículas inhaladas dependen de la ruta (ejemplo: la nasal en comparación con oral), la velocidad de las corrientes de aire y el tamaño de partícula. La deposición nasal se acerca al 100% para todas las partículas  $> 2 \mu\text{m}$  de diámetro. Por el contrario, durante la respiración basal, la deposición pulmonar puede ser llegar hasta el 30% de las partículas entre 2 y  $5 \mu\text{m}$  y aproximadamente un 10% de partículas de 10 a  $30 \mu\text{m}$  de diámetro<sup>29</sup>.

La cuantificación de un alérgeno mayoritario es un buen indicador de exposición si representa una gran proporción (por encima del 40%) de la actividad alérgica del extracto y si guarda una relación consistente con los restantes alérgenos contenidos en la misma fuente. Los distintos alérgenos de una misma fuente son transportados en las mismas partículas, por lo que en general, los resultados obtenidos para un alérgeno mayoritario pueden ser aplicados a otros alérgenos de la misma fuente, como sucede con Fel d 1<sup>37</sup>.

Hay poca información con respecto a otros animales. Estudios ambientales con cobayas detectaron niveles de alérgeno de orina y piel de 17 y  $90 \text{ ng/m}^3$ , respectivamente. Un 40% de la orina son transportados en partículas superiores a  $5 \mu\text{m}$  e inferiores a  $0,8 \mu\text{m}$ , capaces de permanecer en el ambiente durante largos períodos de tiempo.<sup>38</sup>

### ***1.5. Alergia a los roedores.***

La alergia a roedores es comúnmente vista entre investigadores, técnicos y manipuladores de animales. En el ámbito laboral puede llegar a afectar entre el 11 y 44% del personal expuesto<sup>39</sup>. Los síntomas alérgicos debidos a animales de laboratorio fueron descritos por primera vez en la década de 1950<sup>40</sup>. Sin embargo, la importancia de esta condición no llegó a ser aparente hasta grandes estudios epidemiológicos que se llevaron a cabo en la década de 1970 y 1980. Y a pesar de una creciente conciencia sobre la enfermedad en los siguientes años, todavía permanece como causa importante de problemas de salud en dicho medio<sup>41</sup>.

La alergia a roedores se manifiesta como una condición de hipersensibilidad de tipo inmediato, asociada a la producción de IgE específica a las proteínas de dichos animales. Típicamente, los síntomas incluyen rinitis, conjuntivitis, urticaria de contacto, ocasionalmente anafilaxia y asma.

No es sorprendente que la exposición a los alérgenos de roedores en el lugar de trabajo es el factor de riesgo más importante para la sensibilización y posterior desarrollo de los síntomas. Varios estudios, sin embargo, han demostrado que la relación entre la exposición a aeroalérgenos de roedores de laboratorio y la sensibilización y desarrollo de síntomas es compleja<sup>42</sup>.

En algunos estudios, el mayor grupo de exposición a alérgenos de roedores presentó una menor frecuencia de síntomas o sensibilización en comparación con los trabajadores moderadamente expuestos. Este aspecto paradójico de la relación observada en los trabajadores de animales de laboratorio se ha descrito en el pasado, por el “efecto del trabajador sano”, mediante el cual los trabajadores sintomáticos evitan la alta exposición alérgica, dejando a un lado a los trabajadores sanos.

Sin embargo, más recientemente, la demostración de respuestas inmune-específicas que ocurren ante una alta exposición de alérgenos, ha proporcionado una explicación alternativa posible para este hallazgo. La producción de anticuerpos específicos de IgG<sub>4</sub> en ausencia de IgE fue demostrado por primera vez en niños, ante una alta exposición a los alérgenos de gato dentro de los hogares. Esta respuesta fue considerada como una forma de tolerancia natural, como individuos con IgG<sub>4</sub> pero no IgE que no experimentaban síntomas<sup>43</sup>.

La atenuación de la sensibilización y síntomas, debido a una alta exposición a los alérgenos de rata, entre los trabajadores de animales de laboratorio, fue vista en un estudio transversal donde se observó una asociación con un incremento en la prevalencia de individuos a producir altos niveles de anticuerpos IgG<sub>4</sub> rata-específicos. Lo contrario fue demostrado en un estudio longitudinal de trabajadores de laboratorio expuestos a ratas, donde la presencia de altos niveles de IgG<sub>4</sub> predecía una positividad en las pruebas cutáneas y el desarrollo de síntomas respiratorios alérgicos a las ratas<sup>44</sup>.

La relación inversa entre la sensibilización IgE y aumento de anticuerpos IgG específico e IgG<sub>4</sub> fue descrita en algunos estudios epidemiológicos como "respuesta Th<sub>2</sub> modificada" porque el gen que codifica para IgG<sub>4</sub> está en posición 5' con respecto al gen para IgE y es dependiente de la citoquina Th<sub>2</sub> IL<sub>4</sub>. Hasta la fecha, una respuesta modificada Th<sub>2</sub> ha sido demostrada con alérgenos de ratas, de perro y gato, siendo la tolerancia a altas dosis de exposición alérgica una forma de inmunotolerancia natural, produciéndose un aumento de alérgenos específicos IgG y una modesta reducción en títulos de IgE específicos.

### **1.5.1. Exposición a roedores dentro de los hogares.**

La exposición a roedores en el hogar se ha asociado con la sensibilización alérgica en niños de clase media de las zonas suburbanas, niños del centro de la ciudad con asma y adultos con asma en Estados Unidos. Platts-Mills observó que la frecuencia de reactividad de la prueba cutánea a alérgenos de ratón fue menor en niños asmáticos de las zonas rurales en comparación con los reportados en niños de entornos urbanos, lo cual indicaba que había una diferencia notoria en cuanto a la prevalencia de sensibilización IgE-específica a ratón entre diferentes poblaciones y áreas en los Estados Unidos<sup>45</sup>.

En el ensayo anual 2007/2008 realizado por la Asociación Nacional de Técnicos que trabajan con mascotas se informó de un aumento de la prevalencia de los problemas alérgicos relacionados por la exposición masiva a alérgenos de ratón dentro de los hogares del Reino Unido, tal como se demostrara en la recolección de muestras en los hogares durante el transcurso de dicho período<sup>46</sup>.

La exposición a los alérgenos de roedores, dentro del hogar, se ha relacionado con el aumento de la morbilidad del asma en niños en edad preescolar sensibilizados a ratón, que viven en el centro de la ciudad. Y más recientemente, en mujeres con asma de diversos estratos socioeconómicos de las áreas metropolitanas en los Estados Unidos<sup>47</sup>.

La exposición a alérgenos de ratón ha demostrado tener un impacto en la salud mucho más temprano en la vida. Entre los niños con una historia familiar de padres con asma o alergia, la exposición a ratones se asoció con la aparición temprana de sibilancias en el primer año de vida independientemente de otros factores<sup>48</sup>.

Hasta la fecha, la mayoría de estudios han medido los alérgenos de roedores en lugares donde el polvo se asienta como por ejemplo en los muebles; sin embargo no existen datos suficientes para demostrar que el alérgeno principal de ratón (Mus m 1) pueda aerosolizarse



dentro de los hogares. Se ha comprobado que las concentraciones de alérgeno de ratón encontrados aerosolizados en el aire, en muchos hogares urbanos de Estados Unidos, pueden ser similares a los encontrados en las instalaciones donde hay animales, donde los niveles son lo suficientemente altos para provocar síntomas en individuos con sensibilización específica. Una cuarta parte de los hogares urbanos mostraron contener concentraciones de alérgeno de ratón de 0,1 ng/m<sup>3</sup> o superior, que es similar a los niveles encontrados en las instalaciones de investigación animal.

Otro problema añadido es que los alérgenos de roedores pueden ser también transferidos fácilmente desde el lugar de trabajo al hogar. Los alérgenos urinarios de ratas y ratones han sido detectados en los colchones de trabajadores que manipulan animales de experimentación<sup>49</sup>.

Además, los hijos de padres expuestos ocupacionalmente en laboratorios donde se manipulan animales de experimentación, son significativamente más propensos a tener sensibilización específica en comparación con los hijos de padres no expuestos, indicando que la propagación de roedores alérgenos del lugar de trabajo al hogar puede tener un impacto significativo sobre la salud de los niños<sup>50</sup>.

El riesgo de que el ambiente escolar juegue un papel importante en el desarrollo del asma en los niños también debe tenerse en consideración. La exposición a los alérgenos de ratones dentro de las escuelas fue encontrado para como prevalente en las muestras de polvo de 11 escuelas en grandes ciudades del Noreste en los Estados Unidos<sup>51</sup>. Otro estudio encontró un nivel medio de Mus m 1 de 6,24 pg/g en polvo acumulado en las escuelas<sup>52</sup>. Otro estudio comparó los niveles de alérgeno de ratón en las escuelas con los niveles de alérgenos dentro de los hogares y en un subconjunto de los estudiantes que asistían a las escuelas, demostrando niveles significativamente más altos de alérgenos de roedores en las escuelas que dentro de los hogares<sup>53</sup>. En este estudio, el 89% de las muestras tomadas dentro de las aulas contenían proteínas urinarias de ratón, indicando que la exposición de alérgenos dentro de las escuelas puede ser un desencadenante de síntomas de asma.

Al día de hoy no se conocen datos de prevalencia de alérgenos de otros roedores dentro de ambientes que no sea el ocupacional. Se necesitaría realizar ensayos sobre la exposición a otros roedores que se tienen como mascotas, dentro de los hogares y/o ambientes como escuelas o guarderías, para conocer hasta qué punto juega un papel preponderante en el desarrollo de los síntomas alérgicos.

### **1.5.2. Alérgenos de los roedores.**

En los últimos años, los alérgenos de ratón han resultado ser altamente prevalentes dentro de casas en el centro de la ciudad, donde hay niños con asma<sup>48</sup>. Se ha sabido que esta frecuente exposición se ha contribuido a la sensibilización, sugiriendo que estos alérgenos pueden ser importantes entre esta población<sup>48</sup>. Menos se sabe de otros alérgenos de roedores en general. Sin embargo, se sabe que roedores como jerbos, hámsteres y algunas razas de conejos han visto su uso como mascotas dentro de los hogares<sup>54</sup>.

Muchos de los alérgenos de roedores han sido identificados y caracterizados (**Tabla 1**). Los más estudiados y descritos han sido los de ratón y los de rata. Se han identificado tres alérgenos de ratón. Mus m 1 o MUP (proteína urinaria de ratón), que tiene un peso molecular de 19 kDa. Este alérgeno se encuentra en la orina de los roedores así como en folículos de pelo y caspa. Mus m 1 se encuentra en cuatro veces mayor concentración en ratones machos

que de hembras; esto debido a que su expresión genética depende de la testosterona producida en las glándulas adrenales e hígado del ratón macho<sup>55</sup>.

Animales	Alérgeno	PM (kDa)	Fuente	Función biológica
ratón ( <i>Mus musculus</i> )	Mus m 1	19	orina, pelo, epitelio	lipocalina
	Mus m 2	16	pelo, epitelio	desconocida
	albúmina	60	suero	proteína sérica
rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Rat n 1A/Rat n	16-21	orina, pelo, epitelio	lipocalina
	1B (a m-globulina)		saliva	
	albúmina	68	suero	proteína sérica
cobaya ( <i>Cavia porcellus</i> )	Cav p 1	20	orina, pelo, epitelio	lipocalina
	Cav p 2	17	orina, pelo, epitelio	lipocalina
conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Ory c 1	17	pelo, epitelio, saliva	lipocalina

**Tabla 1. Principales alérgenos descritos en roedores y conejo.**

Un segundo alérgeno, Mus m 2, es una glicoproteína con un peso molecular de 16 kDa que se encuentra en el pelo y la caspa, pero no en orina<sup>55</sup>. Un tercer alérgeno es la albúmina, que presenta hasta en un 30% de individuos sensibilizados a ratón.<sup>56</sup>

Previamente, dos alérgenos de rata han sido identificados en orina, saliva, pelo y caspa.

Rat n 1A tiene un peso molecular de 20 a 21 kDa y Rat n 1B tiene un peso molecular de 16 a 17 kDa. Rat n 1A originalmente se pensaba que era una prealbúmina, pero estudios más recientes han demostrado que ambos alérgenos son variantes de una  $\alpha 2$  macroglobulina, los cuales pertenecen a la familia de las lipocalinas<sup>57</sup>.

El pelo de rata contiene cinco principales alérgenos de elevado peso molecular ( $> 22$  kDa), mientras que en las glándulas salivales se han encontrado, al menos, otros cinco alérgenos principales, con bajos pesos moleculares ( $< 22$  kDa). Se han identificado varios alérgenos menores o intermedios más, aunque no han sido aún caracterizados. La albúmina de la rata también posee cierta actividad alérgica, donde hasta el 24% de los individuos alérgicos a las ratas presentan sensibilidad a esta proteína<sup>58</sup>.

Aunque los alérgenos de la cobaya no han sido completamente caracterizados, dos fragmentos antigénicos, denominados Cav p 1 y Cav p 2 han sido identificados, encontrándose en la orina, el pelo y la caspa de este roedor<sup>59</sup>.

Asimismo, los alérgenos de conejo no están bien caracterizados, pero por lo menos dos alérgenos específicos, Ory c 1 y c Ory c 2 han sido identificados. Ory c 1 es una glicoproteína con un peso molecular de 17 kDa que se encuentra en la saliva, el pelo y la caspa, mientras que Ory c 2 se encuentra también en la orina del conejo<sup>60</sup>.

De las Heras *et al* describieron un caso de asma ocupacional en una bióloga que manipulaba y se exponía a jerbos (*Meriones unguiculatus*) en su ámbito laboral. El estudio inmunológico realizado demostró la presencia de una banda fijadora de IgE de 23 kDa tanto en el extracto

de orina como en pelo y muestras recogidas en un filtro colocado en recolector de partículas del modelo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota) presente en el suero de esta paciente<sup>61</sup>.

Tras realizar un estudio mediante técnicas proteómicas, se llegó a caracterizar de forma parcial los 14 residuos aminoácidos de la secuencia amino-terminal de dicha banda proteica, la cual fue la siguiente: SPFDPKELEGEWHTLR. Tras comparar estos resultados en las bases de datos se observó que no habían concordancias con otras secuencias de péptidos descritas en otras especies de roedores, indicando que se trataba de una nueva proteína alergénica, que contenía en su secuencia el típico triplete GXW en la posición 10–12, el cual está presente en la mayoría de las lipocalinas descritas.

González de Olano *et al* publicaron en 2010 un caso clínico de un paciente que desarrolló rinoconjuntivitis y asma perenne por exposición dentro de su hogar a 2 perritos de la pradera (*Cynomys ludovicianus*). Estudiaron los alérgenos en extractos preparados a partir de muestras de pelo y orina. En el inmunoblot aparecieron 3 bandas fijadoras de IgE de 17, 18 y 21 kDa, peso correspondiente al descrito para la familia de las Lipocalinas<sup>62</sup>.

Tras realizar una espectrometría de masas obtuvieron la secuencia peptídica siguiente TVIIAADNEVKIEKDGBIR para las bandas proteicas de 21 y 18 kDa respectivamente, las cuales presentaban una alta homología correspondiente a la estructura primaria de diferentes lipocalinas (73% con la proteína urinaria de ratón MUP y hasta un 78% con la afrodisina del hámster común hembra).

El análisis de la proteína de 17 kDa no presentaba homología con ningún alérgeno descrito previamente comparando las bases de datos; sin embargo, 2 péptidos de esta banda fueron analizados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS), obteniéndose las secuencias de DPAELTGNWR y EELTGAWR, las cuales contienen el motivo de secuencia conservado glicina-X-triptófano (GXW) que es característico de la familia de las lipocalinas.

#### **1.5.2.1. Estructura química y función de la Familia de las lipocalinas.**

La superfamilia de las lipocalinas es un grupo de pequeñas proteínas extracelulares al que pertenecen alrededor de 150 proteínas extracelulares, presentes en vertebrados, artrópodos y bacterias<sup>63</sup>.

El nombre de “lipocalinas” fue propuesto en 1987<sup>64</sup> y, desde entonces, el número de proteínas que cumple con los criterios de esta Familia ha aumentado de forma progresiva<sup>65</sup>. Hoy día se reconoce que, por su similitud estructural, la superfamilia Calicina, las proteínas de unión a ácidos grasos (FABs) y el grupo de avidina/estreptavidina, pertenecen también a esta gran superfamilia<sup>66</sup>. Las lipocalinas son pequeñas proteínas secretadas que se caracterizan por una serie de diferentes propiedades de reconocimiento molecular: su capacidad para unirse a pequeñas moléculas, principalmente hidrófobas (como el retinol), su unión a receptores específicos de la superficie celular y su formación de complejos macromoleculares<sup>65</sup>.

##### ***a.- Estructura y relaciones de secuencia.***

Son proteínas ácidas, la mayoría monoméricas, no glicosiladas, con una masa molecular promedio de 18-20 kDa<sup>63</sup>. La identidad de secuencia entre ellas suele ser baja, por debajo del 20%, pero contienen varios “*motivos*” cortos cuya secuencia de aminoácidos y plegamiento están muy conservados<sup>66</sup>.

La superfamilia de las lipocalinas se compone de un conjunto de proteínas muy estrechamente relacionadas, las lipocalinas centrales (“kernel”), y un número inferior de secuencias más divergentes, las lipocalinas externas (“outlier”)<sup>65</sup>.

Las lipocalinas “kernel”, que constituyen, de lejos, el mayor subconjunto intrínsecamente coherente dentro de todo el conjunto de secuencias relacionadas, comparten tres “*motivos*” de secuencias conservados, en concreto, el triplete GXW (glicina-X-triptófano), que corresponden a las tres principales regiones estructuralmente conservadas del pliegue de la lipocalina, demostrando ser útiles en el diseño de cebadores para estudios de clonación<sup>67</sup>.

Todas las lipocalinas comparten el primero de estos tres “*motivos*” característicos. Pudiéndose utilizar como un elemento diagnóstico de pertenencia a la familia. Las lipocalinas “outlier” comparten no más de dos de estos “tres motivos” y son más variadas, formando grupos distintos en el plano secuencial: las alfa-1-glicoproteínas ácidas (AGP), las proteínas de unión a odoríferos (“odorant-binding proteins”) y las proteínas de las glándulas de von Ebner (VEG)<sup>65</sup>.

Tienen una estructura tridimensional muy conservada denominada barril-beta, constituida por ocho hebras beta-antiparalelas, un alfa-hélice, así como una amplia cavidad donde se aloja el ligando lipopolifílico unión a proteínas odoríferas y las proteínas de las glándulas de von Ebner.

#### ***b.- Funciones de las lipocalinas.***

Aunque anteriormente se habían clasificado como proteínas de transporte, ahora está claro que miembros de la familia de las lipocalinas desempeñan varias funciones diferentes, tales como: participar en el transporte de retinol, coloración críptica, olfacción, transporte de feromonas y síntesis enzimática de prostaglandinas. Las lipocalinas también se han visto implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria y mediación de la homeostasis celular.

##### ***\*Transporte.***

Las lipocalinas se han clasificado en general como proteínas de transporte extracelular. A este respecto están tipificadas como retinol binding protein (RBP), prácticamente el único transportador de retinol en el plasma, que se une a una única molécula transretinol como su ligando fisiológico. La RBP se sintetiza en las células parenquimatosas hepáticas, donde se satura la apoproteína con retinol, provocando su secreción en la circulación general.

##### ***\*Actividad como feromonas.***

La orina de los roedores contiene una gran cantidad inusual de proteína. Este fenómeno se ha estudiado ampliamente en ratas y ratones. MUP (“mouse urine protein”) es el principal componente proteico de la orina de ratón,<sup>68</sup> expresándose en varios tejidos secretores diferentes del ratón<sup>69</sup>.

El lugar principal donde se produce la síntesis de MUP es el hígado. La proteína es secretada por el hígado en el suero, donde circula a niveles relativamente bajos antes de filtrarse rápidamente por los riñones y excretarse<sup>69</sup>. Sin embargo, se ha demostrado la expresión constitutiva de MUP en las glándulas salivales y lagrimales. MUP actúa como un

transportador de feromonas. La proteína puede excretarse en la orina llevando una feromona unida que se libera cuando se seca la orina y se desnaturaliza la proteína.

La alfa-2 macroglobulina, un homólogo de MUP, es el principal componente proteico de la orina de ratas macho adultas, lo que representa un 30%-50% de la proteína total excretada.

La afrodisina, otra lipocalina, es el componente macromolecular principal del flujo vaginal del hámster<sup>70</sup>, y se secreta por el tejido vaginal y las glándulas de Bartolino<sup>71</sup>. Se sabe que estas secreciones, que actúan a través del órgano vomeronasal, provocan una respuesta copulatoria en hámsteres machos<sup>72</sup>.

#### ***\*Propiedades olfativas y gustativas.***

El descubrimiento de proteínas específicas, conocidas normalmente como proteínas de unión a odoríferos (OBP), asociadas al tejido olfativo, y que parecen ser capaces de unirse a moléculas odoríferas con alta especificidad, ha generado un considerable interés; pues varias de estas proteínas son lipocalinas<sup>73</sup>.

Se han identificado dos lipocalinas, expresadas específicamente en las glándulas posteriores y vomeronasales del tabique nasal del ratón. Se ha sugerido que actuaban en la quimiorrecepción de, hasta ahora sin identificar, feromonas lipófilas pequeñas. Una de estas proteínas se inmunolocalizó en el epitelio sensorial vomeronasal, el lugar de recepción primaria de feromonas. Y la inmunoreactividad fue mayor durante períodos en los que el contacto entre animales desempeña un papel importante en la modulación del comportamiento<sup>74</sup>.

Se ha sugerido que otra lipocalina, altamente expresada por las pequeñas glándulas acinares de von Ebner de la lengua, pero no en el conducto secretor, realiza una función similar, en las secreciones salivales, a la de las OBP en la mucosa olfativa: la unión selectiva de productos químicos sápidos y su transporte a receptores del sabor<sup>75</sup>.

#### ***\*Síntesis de la prostaglandina D (PGD<sub>2</sub>).***

La PGD<sub>2</sub> sintasa independiente de glutatión es el principal factor implicado en la síntesis de PGD<sub>2</sub> en el cerebro, lo que representa más del 90% de la actividad en la rata. La PGD<sub>2</sub> es una prostaglandina importante en el cerebro de los mamíferos, que funciona en el sistema nervioso central como un neuromodulador y un factor trófico. La actividad enzimática de la PGD sintasa la hace única entre las lipocalinas<sup>76</sup>.

#### ***\*Inmunomodulación.***

Los niveles plasmáticos de muchas proteínas cambian durante la respuesta de fase aguda, una reacción fisiológica compleja a la tensión y estimulación inflamatoria que juega un papel importante en muchas enfermedades. Las proteínas que muestran concentraciones elevadas se llaman proteínas de fase aguda positivas (PFA), tales como las lipocalinas AGP (glicoproteína ácida), NGAL (asociada con la gelatinasa de neutrófilos), las proteínas placentarias 14 (PP14) y A1M<sup>65</sup>.

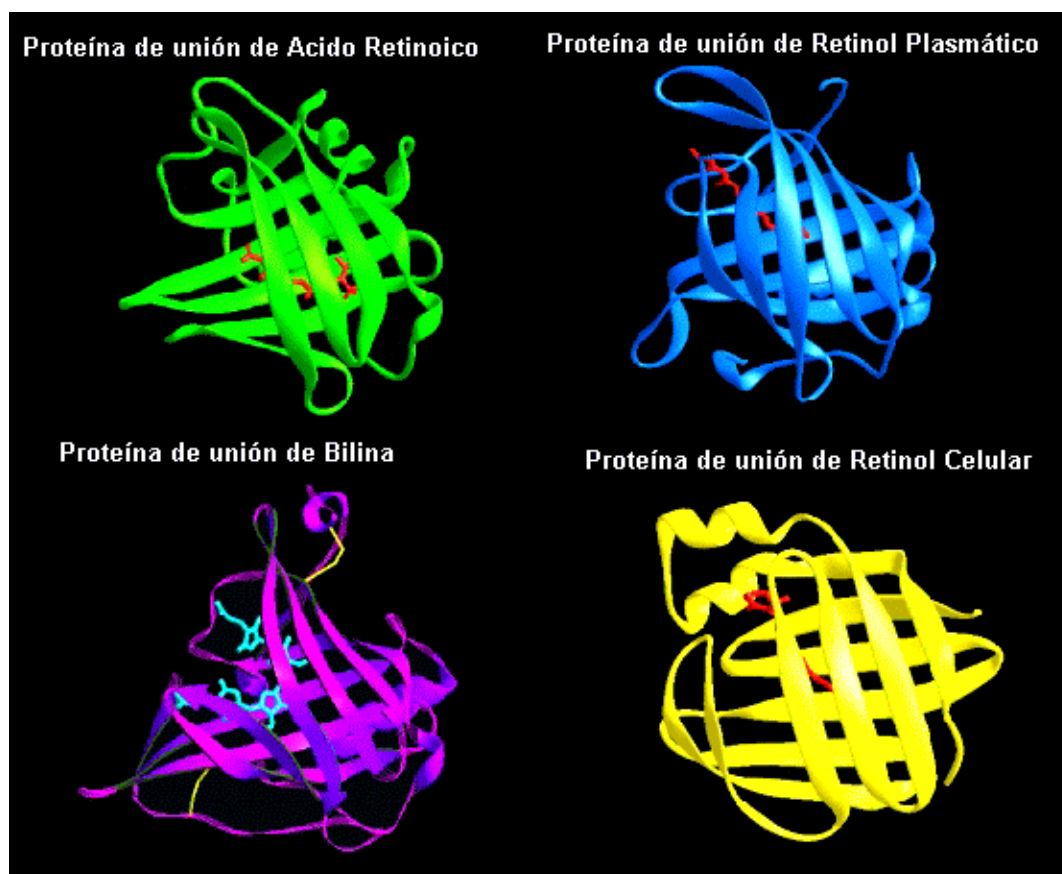
### 1.5.2.2. Las lipocalinas como alérgenos.

Los alérgenos de origen mamífero que se han identificado más tarde como lipocalinas se han estudiado ampliamente durante más de 20 años (**Fig. 1**). En la lista actual de los alérgenos pertenecientes a la familia de las lipocalinas en los mamíferos se encuentran Mus m 1 en ratones; Rat n 1 en ratas; Can f 1 y Can f 2 en perros; Equ c 1 y Equ c 2 en caballos, y Bos d 2 en vacas. Se propagan como aeroalérgenos<sup>77</sup>.

Los alérgenos de gatos son una excepción interesante; ni Fel d 1 ni ningún alérgeno de gato recientemente descubierto, un inhibidor de la cisteína proteasa, son lipocalinas, aunque este último tiene un “*motivo*” parcialmente conservado en Can f 1 y Can f 2. Un alérgeno de insecto, Bla g 4 de la cucaracha *Blattella germanica*, y un importante alérgeno alimentario, Bos d 5 son lipocalinas.

Las personas que trabajan en laboratorios con animales constituyen un riesgo de alergia a los roedores<sup>78</sup>. El alérgeno predominante responsable de la sensibilización a los ratones se encontró en la orina del ratón<sup>79</sup>, pero también está presente en los extractos de pelo y suero<sup>80</sup>. El alérgeno, una prealbúmina, se llamó anteriormente Ag1 o MA1<sup>81</sup>. La denominación actual de este alérgeno es Mus m 1. Mus m 1 se ha comparado con el complejo de proteínas urinarias producidas en el hígado bajo control hormonal<sup>82</sup>.

Las ratas son otra fuente de alérgeno que provocan alergias relacionadas con el trabajo entre las personas expuestas<sup>79</sup>. Rat n 1, el alérgeno de rata predominante, es también una proteína urinaria altamente homóloga a la MUP de los ratones. Dos importantes alérgenos de reactividad cruzada, una prealbúmina y una alfa-2 macroglobulina, se identificaron en un principio en la orina de las ratas. Tenían diferentes tamaños de 17 kDa y 15 kDa<sup>83</sup>.



**Fig. 1. Principales lipocalinas descritas en animales.**

Prahl y cols. identificaron tres importantes proteínas alergénicas en la caspa de vaca, así como en otros tejidos y líquidos corporales, los cuales se denominaron más tarde Bos d 1, Bos d 2 y Bos d 3<sup>84</sup>. En una serie más reciente de estudios, los cADN de tres alérgenos se clonaron a partir del epitelio de la piel de las vacas<sup>85</sup>. Se descubrió que uno de estos últimos alérgenos era idéntico al Bos d 2 de Prahl y cols<sup>86</sup>. Bos d 2 se produce aparentemente por las glándulas sudoríparas apocrinas, pero también está presente un alérgeno similar probablemente relacionado en la orina de vaca. Además, parece que hay varias isoformas de Bos d 2. Por lo tanto, es probable que Bos d 2 pertenezca funcionalmente al mismo grupo de transportadores de feromonas que MUP<sup>87</sup>.

El pelo, la caspa y la saliva son las principales fuentes de alérgenos de perros. A diferencia de los roedores, la orina del perro no parece contener cantidades importantes de alérgenos<sup>88</sup>. Un alérgeno de caspa al que se le denominó en un principio Ag1<sup>89</sup>, D4<sup>90</sup> o Ag8<sup>91</sup> fue el primer alérgeno canino purificado y caracterizado suficientemente para justificar la denominación oficial de Can f 1<sup>92</sup>. Se clonó en 1997 a partir de la glándula parótida y una distribución tisular similar a las proteínas de las glándulas de von Ebner, unas lipocalinas estrechamente relacionadas en la saliva de varias especies<sup>91</sup>. Can f 1 es un alérgeno importante. De Groot y cols. describieron Can f 2, otro alérgeno perteneciente a la familia de las lipocalinas en la caspa de perro, como alérgeno canino 2. Aparentemente es un alérgeno menos importante, ya que en ese estudio sólo el 25% de los pacientes alérgicos tenían anticuerpos IgE anti-Can f 2<sup>88</sup>.

Las personas que entran en contacto con los caballos pueden desarrollar síntomas alérgicos. Actualmente se han reconocido dos alérgenos en la nomenclatura oficial, y ambos son lipocalinas. Equ c 1 es el alérgeno predominante. Fue reconocido probablemente por Stanworth y Lowenstein y cols. denominándolo Ag6<sup>94</sup>. Siguiendo la normativa sobre nomenclatura de aquel momento<sup>95</sup>, los alérgenos de la caspa de caballo Ag6, Ag9 y Ag11 se denominaron en un principio Equ c 1, Equ c 2 y Equ c 3, respectivamente.

Las cucarachas son una fuente de alérgenos en los edificios de apartamentos de nivel socioeconómico más bajo en zonas marginales, porque es donde se han detectado anticuerpos IgE contra cucarachas en un 22%-26% de los pacientes con asma frente al 4%, 5%-6% en los grupos de comparación<sup>96</sup>.

Numerosas proteínas alergénicas están presentes en los extractos de todo el cuerpo de cucarachas y en sus excrementos. El alérgeno perteneciente a la familia de las lipocalinas Bla g 4 se clonó a partir de *Blattella germanica* en 1995, y la prevalencia de anticuerpos IgE frente a Bla g 4 recombinante en pacientes fue del 40%-60%, dependiendo del método analítico.

Turton y cols. analizaron las proteínas urinarias del hámster *Roborowskii* (*Phodopus roborowski*) y encontraron 2 proteínas con masas aproximadas de 6 y 17 kDa, cuyo patrón de expresión mostró poca variación entre individuos o entre sexos. Las huellas peptídicas de masa obtenidas a partir de estas 2 proteínas revelaron una serie de características: 1) las proteínas de una masa dada eran las mismas en todos los individuos independientemente del sexo. 2) la proteína de 6 kDa no era un fragmento de la proteína de 17 kDa. 3) ninguna de las proteínas era un fragmento de una proteína conservada más grande como la seroalbúmina. La espectrometría de masas de preparaciones de proteínas purificadas determinó la masa de la proteína más grande como invariante a  $17144 \pm 2$  Da en todas las muestras. Esta proteína se ha denominado Roborovskina<sup>97</sup>.

### **1.5.2.3. Las albúminas como alérgenos de reactividad cruzada entre mamíferos.**

En la práctica clínica se observa con frecuencia una asociación entre alergia a diferentes animales, sobre todo entre perros y gatos. Aunque esta asociación clínica pudiera ser debida a una co-sensibilización, parece ser más bien consecuencia de una reactividad cruzada entre los alérgenos de animales, fundamentalmente albúminas y lipocalinas<sup>98</sup>.

Las albúminas representan el mayor componente proteico de las proteínas plasmáticas de los animales. Son proteínas de transporte, de peso molecular promedio de 65 a 69 kDa, cuya secuencia y estructura tridimensional están muy conservadas, con un alto contenido en alfa hélices y un gran número de puentes bisulfuro que le confieren estabilidad.

El estudio sobre albúminas como componentes alérgénicos se considera de interés especial porque parece ser que las albúminas representan alérgenos de reactividad cruzada importantes para un porcentaje elevado de pacientes alérgicos a la caspa/pelo de animales, uniéndose a un gran porcentaje de IgE en pacientes sensibilizados<sup>99</sup>.

Las albúminas aparecen en extractos de epitelio y caspa de animales a concentraciones significativas. Es detectada por el 23% al 35% de pacientes alérgicos a gato y perro, respectivamente<sup>100</sup>.

Las hipersensibilidades mediadas por IgE frente a la caspa de los animales, sobre todo a alérgenos de perros y gatos, son de relevancia clínica debido al aumento de la incidencia de asma y reacciones atópicas graves en pacientes con alergia a los animales<sup>101</sup>. Hasta el 30% de los pacientes alérgicos presentan sensibilidad frente a las proteínas de la caspa/pelo de los animales<sup>102</sup>. Una serie de componentes alérgénicos presentes en extractos de caspa/pelo animal se caracterizaron mediante técnicas inmunoquímicas; lo que dio lugar a la identificación de los principales alérgenos del gato, perro, caballo, cobaya y otros roedores<sup>103</sup>. Spitzauer y Pandjaitan estudiaron el grado de reactividad cruzada de las albúminas de perro, gato, cerdo, vaca, oveja, caballo, cobaya, conejo, hámster, ratón y rata. Las albúminas de gato y perro tienen una alta identidad de secuencia, y también con albúminas de otras especies: humana 82,6%, cerdo 81,8%, vaca 77,3%, oveja 78,8%, ratón 75,8%, rata 76,2%. La alta identidad y presencia de epítomos comunes explica la sensibilización a perro y gato en pacientes alérgicos a especies distintas de animales. Concluyeron que las albúminas de perro, gato y caballo representan el alérgeno de reactividad cruzada más importante en pacientes alérgicos a animales<sup>99</sup>.

Cuando se evaluaron diferentes albúminas en ensayos ELISA competitivos, se volvió a demostrar que albúminas de perro y gato se unen a la mayoría de los anticuerpos IgE dirigidos frente a epítomos de albúmina comunes. Sin embargo, tal y como se observó en experimentos con el “método dot blot”, algunos epítomos de IgE parecían ser específicos para determinadas albúminas.

No obstante, la falta de reactividad cruzada de IgE en numerosos pacientes indica la presencia de epítomos sin reactividad cruzada adicionales entre los principales alérgenos del perro y el gato. Por lo tanto, fue posible establecer que determinados pacientes eran inicialmente sensibles frente a alérgenos de una especie, lo que dio lugar a la formación de anticuerpos IgE frente a epítomos frecuentes y específicos de otras especies. La inducción de anticuerpos IgE frente a determinantes comunes puede producir síntomas de alergia tras el contacto con alérgenos relacionados de otras especies. Esta hipótesis no excluye la



posibilidad de que pacientes específicos se sensibilizaran de manera concomitante frente a alérgenos relacionados de especies diferentes.<sup>99</sup>

La presencia de epítomos reactivos a IgE frecuentes entre los principales alérgenos de perros y gatos explica la razón por la cual un gran número de pacientes con alergia a los animales también puede presentar síntomas que influyan al diagnóstico y tratamiento de la alergia a los animales. Un grado limitado de reactividad cruzada indica, no obstante, que los principales alérgenos del perro y el gato no se pueden sustituir entre sí completamente. La elevada capacidad de unión a IgE de albúmina de perro y gato y el fragmento de albúmina de perro recombinante puede potenciar el uso de fragmentos de albúminas de perro o gato recombinantes para el diagnóstico y, quizá, una inmunoterapia para pacientes alérgicos a la albúmina<sup>99</sup>.

## **1.6. Los Hámsteres.**

### **1.6.1. Generalidades.**

Los cricetinos (*Cricetinae*) son una Familia de roedores, conocidos vulgarmente como hámsteres. Se han identificado 18 especies, agrupadas en ocho géneros. Hay 2 especies englobadas dentro del grupo de las llamadas “grandes”, como el hámster común (*Cricetus cricetus*) y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). El resto pertenece por su tamaño a especies medianas y al grupo de los “pequeños o enanos”, donde tenemos 4 especies: el hámster Ruso, el Roborowskii, el de Campbell y el hámster Chino<sup>104</sup>.

La mayoría son originarias de Oriente Medio y el Noreste europeo. Suelen ser dóciles, resultando fácil su cautividad, permitiendo ser utilizados como animales de laboratorio y como mascotas. Se caracterizan por tener una especie de “sacos” o “bolsas” expansibles, llamadas abazones, en el interior de la boca, desde las mejillas hasta los hombros. Etimológicamente la palabra “*hámster*” que es un germanismo, significa “que almacena”.

### **1.6.2. Clasificación taxonómica.**

**Reino:** Animalia

**Filo:** Chordata

**Clase:** Mammalia

**Orden:** Rodentia

**Suborden:** Myomorpha

**Infraorden:** Myodonta

**Superfamilia:** Muroidea

**Familia:** Cricetidae

A partir de la Familia **Cricetidae**, se han reconocido 8 Géneros: *Cricetus*, *Mesocricetus*, *Phodopus*, *Cricetulus*, *Allocricetulus*, *Calomyscus*, *Cansumys* y *Mystromys*.

### **1.6.3. Género Phodopus.**

Este género incluye las 4 conocidas especies de hámster enano: *Phodopus sungorus sungorus* (Hámster Siberiano o Ruso), *Phodopus sungorus campbelli* (Hámster blanco o de invierno), *Phodopus campbelli* (Hámster Campbell) y *Phodopus roborovskii* (Hámster de Roborowski).

### **1.6.3.1. hámster enano Ruso o Siberiano o de Dzungaria (Phodopus sungorus).**

Es originario de la zona de Dzungaria o Zungaria (entre China y Kazajistán en el Asia Central), en el noreste de Rusia o en Siberia (**Fig. 2**).

Es el más común de los cuatro tipos de hámster enanos usados como mascotas. Tiene un tono grisáceo, habitualmente con una franja de pelo más oscuro que va en forma longitudinal desde la punta del hocico por todo el dorso hasta la cola. Adquiere un color blanco uniforme o pelaje invernal cuando la luz solar se reduce a ocho horas diarias o menos.



**Fig 2. Imagen de hámster enano Ruso, Siberiano o de Dzungaria.**

Tiene una esperanza de vida de año y medio a dos años y medio. Su peso ronda los 40-50 gramos. La hembra, que alcanza su madurez sexual en torno a los dos meses de edad, suele entrar en celo unas dos horas cada 4 días, produciendo un cambio en su comportamiento, soliendo quedarse quieta y con la zona genital en espera.

El período de gestación abarca de 18 a 21 días y el número de crías por parto suele ser de 4 a 8, y hasta 12. Dado que existe la probabilidad de que el padre las devore, cuando las crías nacen, se debe retirar al padre del recinto en el que están las crías y la madre. Por lo general, a partir del año y medio de edad aproximadamente, las hembras se vuelven estériles.

El hámster es un animal omnívoro. La base de su alimentación consiste en pienso seco compuesto preparado especialmente para él; es decir, cereales como: trigo, maíz, avena; semillas de girasol o calabaza; alimentos verdes como el diente de león, el trébol y hojas de zanahoria. Además ingieren animales vivos como la larva Tenebrio molitor. Almacena la comida en sus abazones ya descritos anteriormente.

Las causas de sus enfermedades suelen ser debidas a una mala alimentación, al mal estado de la vivienda, problemas respiratorios o digestivos por maltrato y a la sensibilidad al estrés. Aunque, obviamente, también sufren enfermedades infecciosas víricas y bacterianas de difícil solución si no son tratadas a tiempo.

## **1.7. Estudios publicados de Alergia a los hámsteres.**

Debido a que en muchas partes del mundo hay un gran interés por tener hámsteres como mascotas, los casos de hipersensibilidad a estos roedores van en aumento. A pesar de ello, sólo existen unas escasas series de casos publicados, donde se describen algunas características clínicas en estos pacientes. Así mismo, se han podido estudiar, de forma muy general, la presencia de alérgenos en varias fuentes como: pelo, saliva y orina.

De los primeros trabajos donde se hace mención al estudio de los alérgenos de animales en laboratorios de investigación tenemos el de Hook y cols (1984) que realizaron pruebas cutáneas y técnicas *in vitro* de liberación de histamina para evaluar la prevalencia de hipersensibilidad a gato, perro, ratón, rata, conejo, cobaya y hámster entre 130 trabajadores de un centro de investigación biomédica<sup>105</sup>.

De los 130 trabajadores, el 66% tenía síntomas alérgicos al estar expuestos a animales de laboratorio. Dentro de los trabajadores con síntomas alérgicos, el 91% tuvo pruebas cutáneas positivas al menos a un animal. Los autores encontraron que los trabajadores que estaban sensibilizados a ratón, también los estaban a rata (95%), hámster común (*Cricetus cricetus*) (88%), cobaya (83%) y conejo (79%). Los que reaccionaron a los animales antes citados también lo hicieron, pero con mucha menos intensidad, a alérgenos de gato y perro.

Armentia y cols. (1986) informaron de 4 casos de asma bronquial debido a sensibilización a epitelio de hámster común (*Cricetus cricetus*). Los 4 pacientes fueron monosensibilizados. 2 de estos pacientes habían sido diagnosticados previamente de asma intrínseca. Los autores encontraron que, tanto las pruebas cutáneas como el RAST, fueron negativos y la IgE total fue de 80 UI/ml; la técnica autorizada de liberación de histamina resultó positiva y desempeñó un papel fundamental en el diagnóstico<sup>106</sup>.

En un estudio posterior, Armentia y cols. (1989) encontraron que, entre 1800 pacientes de la región de Castilla y León (España), la mayor frecuencia de hipersensibilidad a mamíferos correspondió al gato, seguido por el perro, conejo y vaca; mientras que la frecuencia de alergia al hámster fue muy baja<sup>107</sup>.

Castillo y cols. (1990) documentaron 33 casos de asma producido por hipersensibilidad a hámsteres. Todos los pacientes tuvieron pruebas cutáneas positivas<sup>108</sup>.

Caravaca y cols. (1990) documentaron otros 4 casos de rinitis y asma por hipersensibilidad a hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Según los autores, en los 4 casos los niveles de IgE total en suero fueron elevados<sup>109</sup>.

Ornia y cols. (1994) hicieron un estudio de sensibilización a hámster en el área de Madrid y sus conclusiones, entre otras, fueron: los síntomas son más parecidos a asma ocupacional o intrínseco que al asma atópico; hubo una espectacular mejoría de los síntomas cuando se evitó la exposición a hámster; el diagnóstico se hizo principalmente en base a la historia clínica. Concluyendo que el alérgeno del hámster debe ser un antígeno muy potente<sup>110</sup>.

En el 2002 Bertó y cols. presentaron un grupo de 6 pacientes con síntomas de asma y rinitis tras exposición a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*). En las pruebas cutáneas realizadas con extracto de pelo de esta especie se confirmó su sensibilización. Encontraron que ninguno de los pacientes presentaba anticuerpos IgE específicos para hámster común (*Cricetus cricetus*) ni para hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). En la inmunodetección IgE

realizada se encontraron 2 bandas fijadoras de IgE en 5 de los 6 sueros estudiados, con un peso aproximado entre 18 y 32 kDa. Se realizaron pruebas de provocación bronquial específica demostrando de forma objetiva los síntomas descritos, y a la vez sugirieron que el epitelio del hámster ruso era capaz de sensibilizar a personas expuestas, por lo que podría ser un factor etiológico de enfermedad respiratoria<sup>111</sup>.

En 2002, Tomitaka y cols., documentaron el primer caso de anafilaxia por mordedura de hámster Siberiano en una mujer de 36 años de edad con antecedentes de dermatitis atópica y asma bronquial durante la infancia. En los últimos 2 años había tenido en su casa 3 hámsteres, siendo mordida en las manos en varias ocasiones. En una de las últimas ocasiones presentó una mordedura en la mano izquierda, desarrollando a los 15 minutos un cuadro de urticaria generalizada, rinoconjuntivitis y síntomas de asma, con posterior hipotensión, mareo y palidez<sup>112</sup>.

Se realizó posteriormente la medición de anticuerpos IgE específicos para epitelio de ratón y rata, orina de ratón y rata y proteínas séricas de rata y hámster fueron todas negativas mediante CAP. Se realizaron pruebas cutáneas utilizando extractos caseros preparados a partir de muestras de saliva de los 3 hámsteres, dando positivas con las 3 muestras con habones de 4, 5 y 4 mm respectivamente. No se realizó ningún estudio *in vitro*.

Niitsuma *et al* en 2003 presentaron 2 casos de anafilaxia por mordedura de hámster Siberiano, a una mujer de 23 años y otra de 45 años; ambas con antecedentes de mordeduras previas. La primera presentaba en las pruebas realizadas una medición de anticuerpos IgE específicos (CAP system) clase 2 para epitelio de hámster común (*Cricetus cricetus*) y en la paciente del segundo caso eran resultados negativos<sup>113</sup>.

De nuevo Niitsuma en 2004 presenta un estudio de una serie de 30 casos de asma bronquial en pacientes tras haberse expuesto a varias especies de hámsteres, que fueron recolectados entre 1993 y 2002 en las consultas del Tokio Medical University Hospital. El estudio incluyó el análisis de variables clínicas tales como: sexo, edad, tiempo de latencia, especies de hámsteres, tratamientos recibidos y tabaquismo<sup>114</sup>.

Lim DL *et al* presentaron el caso de 2 niños que fueron ingresados en Urgencias de un hospital tras haber sufrido una anafilaxia inducida por mordeduras de hámster Siberiano. El primer caso se trataba de una niña de 13 años de edad de nacionalidad china, con antecedentes de rinitis y asma por sensibilización a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*), la cual tenía en su hogar 3 hámsteres rusos, siendo mordida hasta en 3 ocasiones en el último año, aunque sin haber presentado síntomas<sup>115</sup>. El día de su admisión en Urgencias había sido mordida en el dedo índice de una mano, desarrollando a los 5 minutos un cuadro de urticaria generalizado y angiodema facial. La paciente nunca había tenido síntomas de ningún tipo previamente tras la exposición a los hámsteres. El segundo caso es el de un niño japonés de 11 años con historia de asma por sensibilización a los ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*), quien también había sido mordido un sinnúmero de veces por los hámsteres que tenía en su casa, aunque sin ningún tipo de reacción, hasta el día en que desarrolló un cuadro de rinoconjuntivitis, urticaria generalizada y angiodema tras ser mordido en un dedo.

Los sueros de ambos pacientes fueron recogidos, con el consentimiento de los padres, para la realización de pruebas *in vitro*. Un SDS-PAGE reveló la presencia de 4 bandas con un rango de peso entre 14 hasta 115 kDa en el extracto de saliva empleado. Una banda de 21 kDa se unió a la IgE en ambos sueros, no hallándose en la del suero control. Además, otra banda de

66 kDa fue reconocida por la IgE de uno de los pacientes. Se realizó un ensayo de ELISA-inhibición demostrando una inhibición parcial con el extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*, lo cual implicaba una posible reactividad cruzada entre *Dermatophagoides pteronyssinus* y los alérgenos de la saliva del hámster Siberiano.

González-Mendiola R y cols. describieron el caso de un paciente de 41 años de edad con síntomas rinoconjuntivales, tos y disnea, coincidiendo con la introducción de 2 hámsteres rusos dentro de su hogar. Anteriormente había sido diagnosticado de asma intrínseco y se mantenía controlado, pero había tenido exacerbaciones asmáticas en los últimos 4 meses. Se realizaron pruebas cutáneas con extractos comerciales de hámster (mezcla de hámster común *Cricetus cricetus* y dorado *Mesocricetus auratus*) así como también resto de batería de alérgenos ambientales. Se realizaron pruebas cutáneas con un extracto casero preparado a partir de pelo y algodón impregnado de restos de cama de la jaula donde se encontraban los hámsteres que contenían orina y heces<sup>116</sup>.

Las pruebas cutáneas fueron positivas. Se realizó una determinación de IgE específica por RAST con resultado de 15 kU/l clase 3 para el extracto de pelo, y >17,5 kU/l clase 4 para el extracto de la cama de la jaula. No se hallaron anticuerpos IgE específicos ni para hámster común ni dorado. Se realizó una inmunodetección IgE encontrándose 3 bandas con pesos moleculares entre los 14-20 kDa.

Finalmente se realizó una provocación bronquial específica utilizando el extracto casero preparado. Se obtuvo una respuesta asmática inmediata con la concentración 1/32 p/v. No se observó una respuesta asmática tardía.

Cisteró-Bahima A y cols (2002) describieron el caso de una mujer de 39 años de edad que había desarrollado asma por exposición a hámster ruso dentro de su hogar con un posterior episodio de angiodema labial después de comer carne de caballo. Durante su infancia había experimentado síntomas de asma por exposición a gato y posteriormente prurito orofaríngeo tras la ingesta de carne de conejo. Este caso recordaba el caso de reactividad cruzada entre epitelio de gato y carne de cerdo, mejor conocido como “Síndrome gato-cerdo”, donde la albúmina sérica es reconocida como el alérgeno causal de este cuadro<sup>117</sup>.

En las pruebas cutáneas realizadas, -que incluyeron alérgenos ambientales comunes-, fueron positivas sólo para gato y perro. Se realizaron pruebas con extractos de epitelio de hámster ruso y cobaya, dando un resultado positivo en ambos casos. También pruebas con diversas muestras de carne fresca mediante técnica de “prick-to-prick”. El resultado fue positivo para ternera, cerdo y caballo, y negativas para carne de pollo.

En el ensayo de inmunodetección (Western blot) realizado se halló una banda de IgE de 65 kDa, reconocida en los extractos de epitelio de gato, hámster, cobaya, carne de ternera, conejo y caballo; correspondiendo por su movilidad electroforética a la albúmina sérica bovina. Se obtuvo una inhibición parcial (30%) mediante RAST-inhibición entre epitelio de hámster ruso y carne de caballo.

En 2010 Torres y cols. describieron la secuenciación del N-terminal de 3 bandas fijadoras de IgE de 18, 21 y 23 kDa respectivamente encontradas en un extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano a partir del suero de una paciente que había sufrido una anafilaxia por mordedura de dicho animal.<sup>118</sup>

Los péptidos de las proteínas fueron analizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados de secuencia del N-terminal para la proteína de 23 kDa fue: NDYAELEG; para la de 21 kDa: NDYAELEG; mientras que no se obtuvo secuencia para la de 18 kDa.

Con la intención de verificar la identificación de dichas proteínas, se realizó una espectrometría de masas en tándem (MS/MS), obteniendo como resultado la secuencia de 2 péptidos internos: AGQETNEMYVVGK y FKPVYATPENIVFTNK. Idénticas secuencias fueron observadas en las 3 bandas del extracto de glándula salival, como también en extractos de pelo y orina, los cuales fueron analizados.

Estos datos obtenidos indicaban que dichas 3 bandas fijadoras de IgE correspondían a una única proteína y sus isoformas. Se revisaron las bases de datos de proteínas utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) e identificándose dichas bandas como proteínas de unión a odoríferos (OBP). Los péptidos obtenidos compartían una homología significativa con las OBP descritas en el topillo rojo (*Myodes glareolus*) que también pertenece a la familia *Cricetidae* y con la afrodisina del hámster común (*Cricetus cricetus*), ambas proteínas pertenecientes a la Superfamilia de las lipocalinas.

Leonor Cedená y cols. presentaron una comunicación oral en el Congreso de Alergia de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), en Pamplona (España) Octubre de 2012. Hicieron referencia a la existencia de reactividad cruzada entre la especie de hámster común y dorado. Observaron en las pruebas *in vitro* realizadas, que el perfil proteico de ambos extractos obtenido por SDS-PAGE mostró un elevado grado de similitud<sup>119</sup>.

El perfil antigénico se determinó mediante inmunodetección, utilizando anticuerpos policlonales producidos previamente en conejo frente al extracto de hámster común (*Cricetus cricetus*), mediante inmunización y posterior sangrado. No se observaron diferencias en el reconocimiento de antígenos de ambos extractos, por el suero de los conejos inmunizados con *Cricetus cricetus*. El ensayo de inmunodetección-inhibición (Western blot-inhibición) demostró que ambos son capaces de inhibir casi totalmente la unión de IgG del otro, por lo que, este hecho, podría justificar el uso de cualquiera de los dos extractos para el diagnóstico de sensibilización a estas 2 especies.



# ***OBJETIVOS***





## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### **2.1. Objetivo general.**

Estudio del perfil epidemiológico, clínico y molecular de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).

### **2.2. Objetivos específicos.**

- 1.- Estudio epidemiológico y clínico de los pacientes expuestos a hámster Siberiano mediante pruebas “*in vivo*” utilizando las distintas fuentes alérgicas presentes en este roedor.
- 2.- Identificación mediante técnicas “*in vitro*” de los alérgenos del hámster Siberiano presentes en las distintas fuentes alérgicas estudiadas.
- 3.- Estudio mediante técnicas “*in vitro*” de la posible reactividad cruzada entre los alérgenos identificados en el hámster Siberiano, frente a los alérgenos, en las mismas fuentes estudiadas, presentes en el hámster común, dorado y Roborowski. Estudio de reactividad cruzada con otras especies de roedores.
- 4.- Caracterización de los alérgenos del hámster Siberiano identificados y reconocidos por los sueros de los pacientes estudiados.
- 5.- Clonación de los alérgenos del hámster Siberiano. Comparación “*in vitro*” de los alérgenos nativos frente a los alérgenos recombinantes obtenidos.



***MATERIAL***  
***Y***  
***MÉTODOS***



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Diseño del estudio.

Se trata de un estudio con objetivo descriptivo, de orientación longitudinal, retrospectiva, con intervención observacional y sin grupo control, donde se estudió una serie de casos clínicos.

### 3.2. Población de estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Sanitarias (IIS)-Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz (IDC), perteneciente a la red sanitaria de la Comunidad de Madrid (España). Se seleccionaron los pacientes (adultos y niños) que fueron vistos en la consulta de Alergología del mismo durante el período comprendido entre Junio de 2005 hasta Diciembre de 2010, quienes estuvieron expuestos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) en su domicilio y que desarrollaron síntomas de tipo alérgico (cutáneos, respiratorios y/o sistémicos).

#### 3.2.1. Criterios de inclusión.

- 1.- Pacientes que estuvieran expuestos únicamente a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), -sin importar el sexo de los animales- dentro de su domicilio y que desarrollaran síntomas alérgicos, que se constatará mediante la anamnesis realizada y que se confirmara mediante la positividad a las pruebas cutáneas realizadas con los distintos extractos de las fuentes alérgicas estudiadas del hámster Siberiano.
- 2.- Pacientes expuestos únicamente a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) dentro de su domicilio y que además de dar positividad en las pruebas cutáneas con los extractos de las fuentes alérgicas estudiadas del hámster Siberiano, presentaran positividad en las pruebas cutáneas realizadas con los distintos extractos de las fuentes alérgicas de otras especies de hámster incluidas en el estudio, como fueron: hámster común (*Cricetus cricetus*), hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y hámster Roborowski (*Phodopus roborowskii*), sin que hubiesen estado expuestos previamente a estas otras especies de hámster.
- 3.- Pacientes que, además de presentar síntomas alérgicos por exposición a hámster Siberiano dentro de su domicilio, tuviesen como antecedentes síntomas de alergia con otros animales domésticos y/o roedores que no fueran hámsteres.
- 4.- Firma del *Consentimiento Informado*. En el caso de menores de edad, dicho consentimiento fue firmado por uno de los padres o tutor.

#### 3.2.2. Criterios de exclusión.

- 1.- Pacientes que estuvieran expuestos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) dentro de su domicilio pero que no desarrollaran síntomas alérgicos. Y constatado mediante la anamnesis realizada y la negatividad en las pruebas cutáneas realizadas con los distintos extractos de las fuentes alérgicas estudiadas del hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).
- 2.- Pacientes que hubiesen estado expuestos previamente a otras especies de hámsteres distintas al hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).
- 3.- Pacientes embarazadas o madres en período de lactancia.

- 4.- Pacientes con trastornos cutáneos o necesidad de medicación que impidiera una correcta valoración de las pruebas cutáneas.
- 5.- Pacientes que padecieran desórdenes mentales que impidieran el normal desarrollo del protocolo.
- 6.- Pacientes que no desearan participar en el estudio.

### **3.3. Aspectos éticos del estudio.**

#### **3.3.1. Consentimiento informado.**

A cada paciente que reunió los criterios de inclusión se le invitó a participar en el estudio. Se le entregó un *Consentimiento Informado*, explicándosele cada detalle del mismo, y donde se le aclaraba la “voluntariedad” de participar, además de la posibilidad de abandonar su participación en el momento que así lo deseara. (Anexo 1).

#### **3.3.2. Confidencialidad de los datos.**

El *Consentimiento Informado* que se le entregó a cada paciente incluido hacía constar la total responsabilidad, de parte del investigador, de garantizar -según la ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal-, informar al paciente que sus datos personales serán incluidos en ficheros informatizados de datos de carácter personal y titularidad del Hospital de la Fundación Jiménez Díaz (IDC), institución responsable del tratamiento y destinataria de los datos. (Anexo 1).

#### **3.3.3. Obtención y conservación de muestras biológicas.**

Tras la firma del debido *Consentimiento Informado* (Anexo 1) se obtuvieron muestras de suero sanguíneo de los pacientes incluidos en el estudio mediante extracción directa y con la colaboración de las enfermeras del Servicio de Alergología. A continuación de la extracción, las muestras fueron centrifugadas, y el suero obtenido se recogió y almacenó en tubos estériles.

Cada muestra fue identificada mediante un número que correspondía a un paciente, garantizando así el anonimato de las mismas. Fueron conservadas en el área destinada para seroteca en los frigoríficos de los Servicio de Alergología e Inmunología (Laboratorio de Inmunoalergia y Proteómica 3) a -20°C hasta la finalización del estudio. Posteriormente se realizó la destrucción y eliminación de las mismas en los depósitos de residuos biológicos existentes para tales fines. Las temperaturas de los frigoríficos eran controladas diariamente mediante los termómetros habilitados para ello, dentro de los frigoríficos mencionados, con la consiguiente vigilancia llevada a cabo por el personal ambos Servicios.

Dichas muestras de suero fueron utilizadas en posteriores ensayos *in vitro* en el Laboratorio de Inmunoalergia.

De igual manera, para la realización de un Test de Activación de basófilos (TAB) se extrajo una muestra completa de sangre a un paciente alérgico a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y a otro paciente no atópico utilizado como control negativo.

### **3.3.4. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica.**

El estudio fue sometido a la evaluación y aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de investigaciones Sanitarias (IIS)-Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz (IDC).

### **3.4. Animales de experimentación.**

Fueron adquiridas 8 parejas de hámsteres adultos de las siguientes especies: (2 parejas por especie): *Phodopus sungorus* (hámster Ruso, Siberiano o de Zungaria) *Cricetus cricetus* (hámster común o Europeo), *Mesocricetus auratus* (hámster dorado) y *Phodopus roborowskii* (hámster Roborowski); cada pareja constaba de un espécimen macho y otro hembra.

Para evitar cruces interespecies, dichas parejas de hámsteres, -por separado cada especie- se mantuvieron estabuladas, dentro de jaulas en el estabulario del Instituto de investigaciones Sanitarias (IIS)-Hospital de la Fundación Jiménez Díaz (IDC).

De los cruces de los hámsteres Siberianos realizados, las crías obtenidas de cada pareja fueron separadas igualmente por especie y sexo.

Con la finalidad de disponer de un mayor número de animales para poder trabajar, se procedió a realizar nuevos apareamientos con animales de la misma especie una vez alcanzada la madurez sexual de los mismos; es decir, entre los 2-3 meses de vida.

En este estudio no se discriminó por el sexo de los hámsteres a los que estuvieron expuestos los pacientes en su domicilio.

El personal del animalario del Hospital se encargó en todo momento de realizar dichas tareas, manipulando los animales acorde a las normas éticas para el cuidado de animales de experimentación; así como manteniéndose a los animales en condiciones óptimas de cuidado y manejo (higiene, temperatura y alimentación).

### **3.5. Obtención y preparación de extractos.**

Como se ha comprobado en la mayoría de los estudios realizados en pacientes alérgicos a otros roedores<sup>56, 83</sup>, las tres fuentes alergénicas principales son: el pelo, la saliva y la orina. Por tales motivos, se decidió obtener dichas fuentes, tanto del hámster Siberiano como de las demás especies de hámster (común, dorado y Roborowski) todas ellas incluidas y comparadas en este trabajo de investigación.

Se solicitó ayuda al Servicio Veterinario y Auxiliar del Animalario, quienes en todo momento se encargaron de la manipulación de los animales y de la obtención de las muestras que nos fueron entregadas posteriormente en tubos y/o alícuotas identificadas.

Obtención de extracto de pelo de los hámsteres: se cortó el pelo a varios hámsteres de cada especie con una máquina de rasurado eléctrica; conservándose el pelo obtenido en frascos de tipo falcon de 50 ml. Los extractos fueron preparados al 10% p/v. Se añadieron 15 ml de PBS (fosfato buffer salino) a 1.5 g de pelo almacenado, agitándose en una noria durante 3 días a 4° C. Luego se centrifugó toda la mezcla, se dializó y se filtró el sobrenadante en filtros



de 0,22 µl, evitándose así la posible transmisión de enfermedades interespecies. Posteriormente los extractos obtenidos fueron liofilizados hasta el momento de la reconstitución con PBS para las pruebas cutáneas.

A una parte de los extractos resultantes se le añadió glicerina en proporción 1:1 para su estabilización y conservación; siendo almacenados e identificados en alícuotas para su posterior uso en pruebas cutáneas (prick-test). Se conservaron en las neveras del Servicio de Alergología a temperatura de entre 5° a 7°C.

Otra parte de los extractos fue almacenada en alícuotas de 1 ml, que fueron identificadas y congeladas a -20°C, para su posterior uso en pruebas “*in vitro*”.

Obtención de extracto de orina de los hámsteres: se colocaron varios hámsteres (cada especie por separado) en una jaula metabólica dentro del recinto del Estabulario durante aproximadamente 72 horas, recolectándose restos de orina mezclados con materia fecal. Fueron centrifugados, dializados, filtrados, conservados y almacenados siguiendo la misma metodología utilizada para la obtención de los extractos de pelo.

Obtención de las glándulas salivales de los hámsteres: Mediante disección quirúrgica se le extirparon las glándulas salivales, las cuales se dejaron durante 24 horas en tubos eppendorf de 2 ml suspendidas en PBS a 4°C.

Dichas muestras fueron únicamente centrifugadas y filtradas. Para su conservación y almacenamiento se siguió la misma metodología utilizada con los extractos de pelo y orina obtenidos de cada especie de hámster incluida en el estudio.

### ***3.6. Cuestionario clínico-epidemiológico.***

A cada paciente incluido en el estudio se le realizó un cuestionario en el que se evaluaron variables individuales de carácter epidemiológico, así como características clínicas tras la exposición al hámster Siberiano. Como forma de conservar el anonimato de cada paciente se le asignó un número a cada cuestionario de cada paciente incluido. (Anexo 2).

En este estudio no se tomó en cuenta la variable sexo del/los hámster/es que tuviera el paciente, ya que no fue considerado un sesgo de selección, como tampoco el número de hámsteres a los que estuviera expuesto el paciente dentro de su vivienda.

El “tiempo de latencia” se definió como el tiempo que iba desde el inicio de la exposición del paciente al/los hámster/es en su domicilio hasta la aparición de síntomas. Dicho tiempo fue medido en semanas.

El “tiempo de mejoría” se definió como el tiempo que iba desde la retirada de los hámsteres del domicilio más la aplicación de tratamiento médico -en el caso necesario- hasta la completa recuperación del paciente. Dicho tiempo fue medido en semanas.

Realizado el cuestionario epidemiológico, a cada paciente se le practicó una auscultación pulmonar y una rinoscopia anterior<sup>120</sup>.

### **3.7. Estudios “in vivo”.**

#### **3.7.1. Determinación de la Fracción de Óxido Nítrico exhalado (FeNO).**

Después de realizar un examen físico (auscultación pulmonar) en la consulta, se condujo a los pacientes al área de pruebas funcionales respiratorias del Servicio de Alergología, donde la Técnico sanitaria practicó una determinación basal de la Fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) a cada paciente, mediante el empleo de un dispositivo medidor portátil NioxMino®<sup>121</sup> (Hispania SL). El resultado obtenido se anotó en el apartado destinado específicamente dentro del cuestionario clínico-epidemiológico. Fueron considerados elevados los valores >25 ppb (partes por billón)<sup>121</sup>.

Para la realización de dicha prueba el paciente debía haber estado al menos 24 horas sin tratamiento con corticoides inhalados solos o en combinación con broncodilatadores y/o corticoides orales, así como no haber fumado en las últimas 12 horas.

#### **3.7.2. Espirometría basal.**

Posterior a la realización de la determinación del FeNO, a cada paciente incluido se le realizó una espirometría basal (Jaeger® software Lab Manager v5 03a), donde se midieron y anotaron los valores correspondientes a la capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>), así como también el cociente respiratorio o Índice de Tiffeneau. Se escogió el mejor valor de 3 maniobras realizadas. Se consideró el Índice de Tiffeneau normal en cocientes mayores al 70%. La unidad de medida para la CVF y el VEF<sub>1</sub> fue en litros (L)<sup>122</sup>.

Del mismo modo, se realizó una espirometría tras uso de broncodilatador utilizándose para ello una dosis inhalada de Terbutalina en dispositivo turbohaler®. Los valores obtenidos fueron anotados en la hoja del cuestionario.

Para la realización de la prueba, el paciente debía haber suspendido los broncodilatadores 6 a 12 horas antes, y las teofilinas 12 horas o más antes de la prueba. Debía evitar comidas copiosas y no haber fumado en las 2 horas previas a la realización del test. Tampoco debía haber ingerido bebidas con cafeína las 6 horas previas ni realizar ejercicio físico intenso 30 minutos antes.

#### **3.7.3. Pruebas cutáneas.**

A cada paciente se le hicieron pruebas cutáneas por el método de “prick-test” con una batería de extractos comerciales estandarizados de neumoaérgenos habituales (ALK-Abelló, Madrid), que incluían extractos de pólenes de gramíneas (*Cynodon*, *Phragmites*, *Secale* y *Lolium*), árboles (*Cupressus*, *Platanus* y *Olea*) y malezas (*Parietaria*, *Salsola*, *Chenopodium*), cucarachas (*Blattella germanica* y *orientalis*), epitelios de perro y gato, ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *farinae*) y algunas especies de hongos ambientales (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*)<sup>123</sup>.

Del mismo modo, se realizaron pruebas cutáneas con el método de “prick-test” con una batería de extractos comerciales estandarizados (ALK-Abelló, Madrid) de animales y roedores que incluía: vaca, caballo, conejo, ratón, rata y cobaya.

Se realizaron pruebas cutáneas con el método “prick-test” con los extractos de pelo, glándulas salivales y orina de hámster Siberiano, dorado, común y Roborowski obtenidos, cuantificados y preparados previamente, como se ha explicado anteriormente.

Al no estar estandarizados los extractos de las distintas especies de hámster estudiadas, las pruebas cutáneas fueron realizadas mediante la técnica de “titulación a punto final”<sup>124</sup>, que consiste en determinar la concentración mínima capaz de inducir una respuesta IgE-específica mediante la realización de pruebas cutáneas por el método de “prick-test” con distintas diluciones del extracto en estudio.

Las pruebas se realizaron en cada paciente en la superficie volar del antebrazo. Se puncionaron los extractos utilizando una lanceta estandarizada de 1 mm de longitud (Dome-Hollister-Stier, Berkshire, UK.). Se utilizó hidrocloreto de histamina (10 mg/ml) como prueba de control positivo y cloruro de sodio 0'9% glicerinado, como control negativo, para excluir dermatografismo. La lectura de las pruebas se realizó a los 15 minutos.

Fueron consideradas positivas aquellas que presentaron un habón y/o pápula igual o mayor de 3 mm de diámetro mayor comparadas con el control negativo (cloruro de sodio 0'9%)<sup>123</sup>. A los pacientes que estuvieran tomando antihistamínicos por cualquier motivo, se les indicó la suspensión de dichos medicamentos y la posposición de la realización de las pruebas cutáneas, como mínimo 72 horas después.

Como forma de descartar un posible efecto irritativo de los extractos de las fuentes alérgicas obtenidas de las distintas especies de hámsteres estudiadas, se realizaron pruebas cutáneas en 5 pacientes voluntarios no atópicos.

#### **3.7.4. Determinación de IgE específica.**

Tras la obtención del *Consentimiento Informado* se extrajo una muestra de sangre. Una parte fue centrifugada, identificada y almacenada a -20°C en la parte correspondiente a seroteca en los frigoríficos del Servicio de Alergia del Hospital de la Fundación Jiménez Díaz (IDC) destinada para los posteriores ensayos “*in vitro*”.

El resto de sangre obtenida se llevaba y entregaba al personal del laboratorio de Análisis Clínicos generales del Hospital, -con la solicitud previa por escrito- para realizar una determinación de IgE específica por método de CAP-FEIA®<sup>125</sup> (Phadia-Thermofisher), para epitelios de animales domésticos (perro, gato, vaca y caballo) y algunos roedores (rata, ratón, cobaya, hurón), así como también para hámster común (*Cricetus cricetus*).

De igual modo, se realizaron determinaciones de IgE específica de alérgenos de perro (Can f 1, Can f 2, Can f 3 y Can f 5), gato (Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4) y caballo (Equ 1). No se realizó determinación de IgE específica para hámster Siberiano por no existir disponible en el mercado. La unidad de medida para el CAP es de kU/l.

#### **3.7.5. Revisión de los pacientes incluidos en el estudio.**

A los 6 meses después de haber sido vistos, diagnosticados y haberles indicado tratamiento, se realizó una revisión en consulta de Alergia a cada paciente incluido en el estudio.

Durante la revisión se realizó una anamnesis, examen físico (auscultación pulmonar). Se realizó nuevamente una determinación del FeNO, una espirometría basal y test post-

broncodilatador, además de las correspondientes pruebas cutáneas “prick-test” con los extractos de pelo, glándulas salivales y orina de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), dorado (*Mesocricetus auratus*), común (*Cricetus cricetus*) y Roborowski (*Phodopus roborowskii*) obtenidos, cuantificados y preparados previamente, como se había realizado en la consulta 6 meses antes, durante la primera visita y/o inclusión en el estudio.

A aquellos pacientes que estuvieron tomando antihistamínicos en el momento de la consulta, bien por persistencia de síntomas o por cualquier otro motivo, se les indicó la suspensión de dichos medicamentos y la posposición de la realización de las pruebas cutáneas, como mínimo 72 horas después de dicha suspensión.

Los resultados de todas las pruebas realizadas en la revisión a los 6 meses fueron recogidos tanto en su correspondiente historia clínica hospitalaria como en el apartado específico del cuestionario clínico-epidemiológico utilizado en este Estudio.

### **3.8. Pruebas de provocación.**

#### **3.8.1. Provocación nasal específica (PNE).**

Bajo *Consentimiento Informado* (Anexo 3), en días separados se realizaron a dos pacientes que presentaban síntomas de rinoconjuntivitis por exposición a este tipo de hámster dos provocaciones nasales específicas con extracto de pelo de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) en el área de pruebas de provocación respiratoria del Servicio de Alergología del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz (IDC), a dos pacientes que presentaban síntomas de rinoconjuntivitis por exposición a este tipo de hámster. Se les indicó la suspensión del uso de antihistamínicos y corticoides tópicos nasales, que estuviesen utilizando al menos 72 horas antes de la realización de la prueba<sup>126</sup>. También se realizó una Rinometría Acústica (RA) a cada paciente en condiciones basales a temperatura ambiente<sup>127</sup>.

Se prepararon distintas diluciones con el extracto de pelo de hámster Siberiano, las cuales fueron guardadas y conservadas en frascos estériles y debidamente identificadas. Se procedió a realizar una titulación a punto final (peso/volumen)<sup>124</sup>.

Inicialmente se instiló suero salino 0’9% con un spray en cada fosa nasal para ver la respuesta basal al realizarse posteriormente un RA.

Se fueron realizando instilaciones nasales (bilateral) con las distintas diluciones preparadas con intervalos de 15-20 minutos aproximadamente. Tras cada instilación se realizaba una RA y una valoración analógica de los síntomas (prurito nasal, ocular, estornudos, congestión nasal, rinorrea, lagrimeo, eritema conjuntival). Se utilizó una puntuación analógica (score) {0: ninguno, 1: leve, 2: moderado, 3: severo}.

Se consideró positiva la prueba cuando, tras haberse realizado una RA después de la instilación de una dilución, se obtuvo una disminución del área transversal mínima (ATM) igual o mayor al 25% con respecto al valor basal<sup>126</sup>.

Tras la positividad de prueba, ésta se suspendía y se le instilaban dos pulverizaciones de un spray nasal descongestionante que contenía un vasoconstrictor simpaticomimético (fenilefrinana). Se esperaban aproximadamente 15 minutos y se procedía a realizar una nueva RA, para comprobar la recuperación basal del ATM en ambas fosas nasales.

### 3.8.2. Provocación bronquial específica (PBE).

Se realizaron -bajo *Consentimiento Informado* (Anexo 4)- dos provocaciones bronquiales específicas a dos pacientes que presentaban síntomas de asma tras exposición a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*)<sup>128</sup>. Las mismas fueron realizadas utilizando extracto de pelo de dicho hámster. Fueron realizadas en días separados en el área de pruebas de provocación respiratoria del Servicio de Alergología del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz (IDC).

A cada paciente se le indicó que suspendiera el uso de corticoides inhalados, así como broncodilatadores 48 horas antes de la realización de la prueba.

El primer día se realizó una determinación del FeNO basal a cada paciente<sup>121</sup>. A continuación se realizó una inducción de esputo basal, tal como describen Pin y cols.<sup>129</sup> Se realizaba una rápida medición del flujo espiratorio forzado (FEF) antes y después de una inhalación de salbutamol 200 µg para prevenir una posible constricción de la vía aérea. Se realizaron tres mediciones cada vez, anotando la del valor más alto. Se nebulizó suero salino hipertónico usando un nebulizador ultrasónico (Ne-U10B, Omron Corp., Japón) durante un período de 20 minutos.

La concentración de salino utilizada era del 3% seguida del 4%, y por último del 5%, cada concentración durante 7 minutos. Se le indicaba al paciente que tosiera durante la nebulización, interrumpiendo brevemente la inhalación del suero salino hipertónico, para expectorar en una placa de Petri. Las muestras de esputo eran procesadas y homogeneizadas, añadiendo 20 ml. de tripsina 0,001 mg/ml (Merck, Darmstadt, Alemania) a suero salino<sup>130</sup>.

Las muestras eran entonces incubadas a una temperatura de 60°C durante 30 minutos y centrifugadas a 20.000 rpm durante 10 minutos. Las células eran suspendidas en salino y teñidas mediante los métodos de Papanicolau y Giemsa para contar las diferentes células. Mediante una citometría de flujo<sup>131</sup>, en el Laboratorio de Inmunología, se determinaron las distintas poblaciones celulares presentes en la muestra de esputo recogido.

A continuación se procedió a realizar una provocación bronquial inespecífica (Test de metacolina)<sup>132</sup> para medir el grado de Hiperactividad bronquial de cada paciente.

Se realizó mediante el “método de volumen corriente”<sup>133</sup>, utilizándose un nebulizador DeVilbiss 646 de presión continua (DeVilbiss Co. Somerset, Pa, USA) a un flujo de 0,28 ml/min. Se utilizó hidrocloreto de metacolina (Provocholine®, Methapharm) partiendo de una concentración “madre” de 16mg/ml, y que a partir de la cual se realizaron las distintas diluciones a la mitad de forma progresiva.

Tras la inhalación de cada dilución, se realizaba una espirometría a los 30 segundos y luego a los 2 minutos, anotándose el valor del VEF<sub>1</sub>.

Se consideró positiva la prueba una vez que, durante la misma, en cualquiera de las mediciones realizadas (el mejor valor de las 3 espirometrías realizadas), el valor de volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>) disminuyera hasta un 20% con relación al valor de la medición del VEF<sub>1</sub> realizada tras la inhalación del diluyente utilizado (suero salino 0'9%).

De igual modo, se consideró positiva aquella prueba que, independientemente se alcanzara una disminución de hasta un 20% con relación al valor de la medición del VEF<sub>1</sub> post-diluyente (suero salino 0'9%), el paciente presentara síntomas de tipo respiratorio (tos, dificultad respiratoria etc) de tal intensidad que le impidiera continuar la realización de la prueba.

Una vez realizada la prueba en cada paciente, se determinaba la PC<sub>20</sub>, que es la concentración de provocación capaz de inducir una caída de al menos el 20% del VEF<sub>1</sub> con respecto al valor del VEF<sub>1</sub> tras la inhalación del diluyente (suero salino 0'9%).

$$\text{Fórmula: } PC_{20} = \frac{(20 - R1) (C2 - C1)}{(R2 - R1)} = \% \text{ de caída del VEF}_1$$

C2: concentración de dilución posterior al resultado de la caída del VEF<sub>1</sub>.

C1: concentración de dilución anterior al resultado de la caída del VEF<sub>1</sub>.

R2: valor del resultado de la concentración de dilución (C2).

R1: valor del resultado de la concentración de dilución (C1).

Criterios de Hiperactividad bronquial según valores de la PC<sub>20</sub><sup>134</sup>

- No Hiperactividad: PC<sub>20</sub> = 8-16 mg/ml.
- Hiperactividad leve: PC<sub>20</sub> = 2-8 mg/ml.
- Hiperactividad moderada: PC<sub>20</sub> = 2-0,25 mg/ml.
- Hiperactividad severa: PC<sub>20</sub> = < 0,25 mg/ml.

Al día siguiente de realizarse el Test de metacolina basal se realizó la PBE con extracto de pelo de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*). Para la cual previamente se realizó una titulación a punto final (peso/volumen)<sup>124</sup>, y posteriormente se realizó la provocación utilizándose un nebulizador DeVilbiss 646 de presión continua (DeVilbiss Co. Somers, Pa, USA) a un flujo de 0,28 ml/min.

El paciente inhalaba el extracto a dosis crecientes progresivas. Las dosis se fueron incrementando con intervalos de 10 minutos. Los valores del VEF<sub>1</sub> y la CVF fueron medidos cada 5 y 10 minutos después de cada concentración inhalada<sup>128</sup>.

Los resultados de esta prueba fueron expresados con las distintas concentraciones del extracto, hasta encontrar aquella concentración de extracto suficiente de ser capaz de producir una caída del VEF<sub>1</sub> de un 20% (PC<sub>20</sub>), considerando de esta forma la prueba positiva<sup>128</sup>. Al final de la provocación se realizaron espirometrías cada 10 minutos durante la primera hora post-provocación.

Posteriormente se realizó una monitorización horaria del VEF<sub>1</sub> mediante el empleo de un dispositivo portátil AMOS Jaeger® que le fue entregado al paciente. De igual modo, se le entregó una hoja donde el paciente anotaba las mediciones horarias del VEF<sub>1</sub> registradas por el AMOS.

Al día siguiente la información almacenada en el dispositivo portátil AMOSJaeger® fue analizada mediante el software para AMOS Jaeger®. Dicha información obtenida fue comparada y corroborada con la información recogida por el paciente en la hoja de anotaciones que se le había entregado el día anterior.

Se consideró positiva la prueba una reducción del VEF<sub>1</sub> igual o mayor al 20% (con relación al VEF<sub>1</sub> basal pre-PBE) en cualquier momento del seguimiento horario y/o de un 15% si iba acompañado de síntomas rinoconjuntivales o de tos.<sup>135</sup>

De igual forma al día siguiente de la PBE se realizaba una recogida de esputo y consiguiente procesamiento, tal como se describió para la inducción del esputo basal. Dichas muestras se enviaron al Servicio de Inmunología para determinarse las distintas poblaciones celulares presentes mediante citometría del flujo<sup>131</sup>.

Se realizó una prueba bronquial inespecífica (Test de metacolina) como control 24 horas posteriores a la PBE<sup>133</sup>.

### **3.8.3. Test de exposición controlada.**

Se realizó un test de exposición controlada a una paciente que había tenido hámsteres Siberianos en su domicilio con los que presentaba síntomas rinoconjuntivales y de asma. Para la misma firmó un *Consentimiento Informado* (Anexo 5).

El estudio se realizó durante 3 días seguidos en el área de pruebas de provocación respiratoria del Servicio de Alergología del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz (IDC).

#### ***Día 1º.***

Se realizó una determinación de la Fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) basal<sup>121</sup>, y a continuación se realizó una espirometría basal.

Se tomó una muestra nasal de moco adherido a cornetes inferiores mediante un asa estéril para realizar posteriormente una citología nasal basal. La muestra fue extendida en un portaobjetos, fijada con citospray y posteriormente teñida, para luego observar la celularidad con microscopio óptico.

Se extrajo una muestra de sangre que después fue centrifugada y almacenada a -20º para su posterior uso en pruebas “*in vitro*”.

Se realizó una inducción de esputo basal tal como se ha descrito anteriormente, enviándose la muestra al Servicio de Inmunología para realizarse estudio de celularidad por medio de citometría de flujo<sup>130</sup>.

Se realizaron pruebas cutáneas con los distintos extractos de pelo, saliva y orina de hámster Siberiano y las otras tres especies de hámster incluidas en el estudio.

Como forma de comprobar el efecto de los alérgenos sobre la mucosa nasal, se realizó una rinometría acústica basal tal como se ha descrito anteriormente.

Finalmente se realizó una provocación bronquial inespecífica (Test de metacolina) basal<sup>131</sup>, también descrita anteriormente.

Posteriormente se realizó una monitorización horaria del VEF<sub>1</sub> mediante el empleo de un dispositivo portátil AMOS Jaeger® que le fue entregado al paciente. De igual modo, se le entregó una hoja donde el paciente anotaba las mediciones horarias del VEF<sub>1</sub> registradas por el AMOS.

## ***Día 2º.***

A primera hora de la mañana se trajo del estabulario del Hospital una jaula conteniendo 4 hámsteres Siberianos, que fueron colocados en el suelo de la cámara de provocación inhalativa de 7 m<sup>3</sup>.

Se colocó un medidor de partículas ambientales aerosolizadas (DustTrak™ Aerosol Monitor 8520) dentro de la cámara. Una vez que se colocaron los hámsteres dentro y las mediciones obtenidas, éstas fueron anotadas de forma progresiva en una hoja para tales fines.

De igual manera, se colocó dentro de la cámara de provocación un filtro automático de partículas de tipo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota), que permaneció desde la introducción de los hámsteres en la jaula hasta una vez finalizado el test de exposición.

Se citó al paciente 2 horas después de estar los hámsteres dentro de la cámara de provocación inhalatoria. A su llegada se procesó la información recogida de las mediciones del VEF<sub>1</sub> en las últimas 24 horas que había realizado, tal como se describió en el apartado de la PBE.

Se realizó una determinación del FeNO y una espirometría basal. Se le colocó una bata estéril a la paciente y se la indicó que entrara dentro de la cámara de provocación y se sentara en una silla colocada dentro frente a la jaula que contenía los hámsteres. En primer lugar sólo permaneció 1 minuto de exposición. A continuación se procedió a realizar una espirometría a los 30 segundos y a los 2 minutos.

Se realizaron exposiciones cada vez de mayor duración hasta que la paciente presentó síntomas rinoconjuntivales y/o de asma, que fueron objetivados mediante la caída del VEF<sub>1</sub> de un 20% con relación al valor de VEF<sub>1</sub> basal. Los síntomas fueron anotados en una hoja para dichos fines.

Una vez que la prueba dio positiva se suspendieron las exposiciones. Como medicación de rescate se contó con el uso de antihistamínicos (cetirizina 10mg) y broncodilatadores de rescate (salbutamol inhalado 200 µg). Se realizaron monitorizaciones espirométricas cada 10 minutos durante una hora posterior a la exposición.

Se le entregó de nuevo una hoja de anotaciones del VEF<sub>1</sub> y el dispositivo portátil AMOS Jaeger® para la medición horaria hasta el día siguiente, que era cuando debía volver. Se realizaban tres mediciones cada vez y se anotaba la del valor más alto.

Las muestras recogidas por las membranas de politetrafluoretileno colocadas en el filtro automático de partículas de tipo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota) fueron procesadas mediante la elución de las mismas, para posteriormente realizar una inmunodetección del extracto con el suero recogido de la paciente.

Se realizó una Rinometría Acústica (RA) post-exposición de la misma manera que se realizó de forma basal. Se medicó a la paciente por medio de la pulverización de un vasoconstrictor tópico nasal y se volvió a realizar una medición de los volúmenes nasales y del área transversal media, con la finalidad de comprobar recuperación de los valores basales tras la aplicación del medicamento.



### ***Día 3º.***

Se recogió la hoja de anotaciones entregada a la paciente. Se extrajo la información almacenada en el dispositivo portátil AMOS Jaeger® que se le había entregado el día anterior. Se procesó la información recogida de las mediciones del VEF<sub>1</sub> en las últimas 24 horas que había realizado, tal como se describió en el apartado de la PBE.

Se realizó una determinación de la Fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) basal<sup>121</sup>, y a continuación se realizó una espirometría 24 horas post-exposición.

Se tomó una muestra de moco nasal para realizar una citología nasal, tal como se realizó el primer día de la prueba.

Se realizó una prueba bronquial inespecífica (Test de metacolina) como control 24 horas posteriores a la exposición<sup>133</sup>.

### ***3.9. Análisis estadístico.***

#### **Espirometrías y Determinación de FeNO**

Se realizó una correlación comparativa entre los valores espirométricos y de las mediciones de la Fracción exhalada del Óxido Nítrico (FeNO) de la visita basal (pre) y la revisión a los 6 meses (post). Se muestra una descripción de los datos de cada tabla mediante la Media y la Desviación Estándar (DS) y luego la diferencia (post – pre). Es decir los valores hallados en la visita a los 6 meses menos los de la visita basal. Estas diferencias se resumieron mediante la Media, el Intervalo de confianza al 95%, y el valor de p se obtuvo comparando los valores pre y post mediante la prueba paramétrica t de Student para muestras dependientes. Se consideró un valor de p inferior a 0.05 estadísticamente significativo.

Se compararon las frecuencias de pacientes que presentaron valores espirométricos normales: VEF<sub>1</sub> (volumen espiratorio forzado en el primer segundo), el cociente o Índice de Tiffeneau VEF<sub>1</sub>/CVF (capacidad vital forzada) y el FeNO antes y después de las medidas de tratamiento adoptadas.

Se consideró como normal el valor del cociente o Índice de Tiffeneau > 70%. Se consideró como normal el valor del VEF<sub>1</sub>>80%<sup>122</sup>. Se consideró como punto de corte de normalidad para las determinaciones del FeNO el valor de 25 ppb (partes por billón) hasta 25 ppb: normal; > 25 ppb: elevado<sup>121</sup>.

Se muestran el número y el porcentaje de pacientes que presentaron valores normales y las diferencias entre los porcentajes, junto con su intervalo de confianza al 95%. El valor de p se obtuvo comparando los datos pre y post mediante la prueba paramétrica de Mc Nemar. Se consideró estadísticamente significativo todo valor de p < 0.05.

#### **Tiempo de latencia Vs número de sensibilizaciones**

Se realizó una correlación entre el tiempo de latencia y el número de sensibilizaciones, mediante la prueba de asociación de Fisher. Para ello se calcularon el número de sensibilizaciones (positividad a las pruebas cutáneas con los distintos extractos: pelo, glándulas salivales y orinado las 4 especies de hámsteres que fueron incluidas) que

presentaba cada paciente y se correlacionaron con los distintos tiempos de latencia (< 4 semanas, 4-8 semanas, 8-12 semanas y >12 semanas) en que fueron clasificados los pacientes. Se consideró estadísticamente significativo todo valor de  $p < 0.05$ .

#### Tiempo de latencia Vs número de síntomas

Se realizó una correlación entre el tiempo de latencia y el número de síntomas, mediante el empleo de la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado. Se realizó una tabla de cruzada de asociación, considerando cada síntoma (rinoconjuntivitis, asma o anafilaxia) por separado. Se consideró estadísticamente significativo todo valor de  $p < 0.05$ .

#### Tiempo de latencia Vs Tiempo de mejoría

Se realizó una correlación entre el tiempo de latencia y el tiempo de mejoría. Los tiempos de mejoría se recogieron de forma agrupada (<4 semanas, 4-8 semanas, 8-12 semanas, >12 semanas) por lo que se consideraron variables de tipo cualitativo. Se realizó una tabla de contingencia cruzando ambas variables aplicándose el test no paramétrico de Chi-cuadrado.

### **3.10. Estudios inmunológicos “in vitro”.**

#### **3.10.1. Listado de soluciones buffer o tampones.**

- **PBS** (Phosphate Saline Buffer): 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 150 mM NaCl, pH 7.2
- **PBS-T 0, 1%**: PBS con 0, 1% (v/v) de Tween 20.
- **PBS-T 0,05%**: PBS con 0,05% (v/v) de Tween 20.
- **Tween 20**: monolaurato de polioxietilensorbitano.
- **Tampón de electroforesis**: 0,025 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.192 M Glicina y 0,1% (p/v) SDS.
- **Tampón NET**: 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.05 M EDTA, 0.5% (v/v) Tritón X-100, pH 7.5.
- **Solución Azul de Coomassie R-250**: 0.3% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético.
- **Tampón de transferencia**: 4.8 mM Tris-HCl, 3.9 mM Glicina 20% (v/v) metanol y 0.036% (p/v) SDS.
- **Tampón de bloqueo (Western blot)**: 3% (p/v) leche desnatada, 3% (p/v) BSA, PBS-Tween 0,1%
- **Tampón de bloqueo (ELISA)**: PBS 1X, PBS-Tween 0'1%, 3% (p/v) BSA.
- **Tampón de carga de electroforesis**: 6.25mM Tris, 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) Glicerol; pH=6.8

#### **3.10.2. Cuantificación de proteínas.**

La concentración de proteínas de las fuentes alérgicas estudiadas (pelo, glándulas salivales y orina) de las 4 especies de hámsteres estudiadas, así como la membrana de filtro Air sentinel recogida tras el test de exposición a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), fue determinada según el método de Bradford<sup>136</sup>, utilizando el reactivo azul de Coomassie Plus (Pierce), siguiendo el las instrucciones del fabricante.

Se utilizó una placa de 96 pocillos (cos 96 rts Corning 96®). Se realizó la lectura de cada placa mediante el aparato lector TECAN infinite F200, con el software "I-Control 1,6", leyendo a una absorbancia de 620 nm.

Del mismo modo, se realizó para la cuantificación de concentración de proteínas de la proteína recombinante de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) obtenida.

### **3.10.3. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Las electroforesis de los distintos ensayos realizados se llevaron a cabo según el método de Laemmli<sup>137</sup> en condiciones reductoras. La polimerización de los geles y el desarrollo de las electroforesis se llevaron a cabo en los sistemas de Hoeffer y Mini-Protean III de Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron de Bio-Rad.

Las concentraciones de acrilamida fueron del 14% (p/v) para el gel separador, y del 5% (p/v) para el gel concentrador. Las muestras se prepararon en tampón de carga y, posteriormente, se desnaturalizaron calentando 5 minutos a 95°C. Se cargó cada pocillo una cantidad de proteína correspondiente a 30 µg.

Realizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 para su visualización.

### **3.10.4. Preparación de pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

Se tomaron 100 µl de 5 sueros de 5 pacientes alérgicos a hámster Siberiano a los que se añadieron: 4 ml de agua miliQ más 500 µl de solución NET 10X. Se conservó en el frigorífico a -20°C hasta su uso en ensayos posteriores.

### **3.10.5. Ensayos de inmunodetección.**

Terminadas las electroforesis de los geles, las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad) según el método de Towbin *et al.* de transferencia semiseca (Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76, 4350-4) durante 15 minutos a 15 voltios<sup>138</sup>.

La eficacia de la transferencia se comprobó mediante tinción de las membranas con el colorante Rojo Ponceau® (Sigma) para visualizar las bandas proteicas. Los marcadores de peso molecular (Broad range, Bio-Rad®) se marcaron sobre una base de cristal con un lápiz de carbón. Se realizaron lavados con agua miliQ para eliminar los restos del colorante antes de ser bloqueadas.

Tras el bloqueo se realizaron lavados con PBS-T 0,1%. Se incubaron las membranas con el suero diluido en NET 1X a 4°C toda la noche (aproximadamente 18 horas). Al día siguiente se realizaron lavados con PBS-Tween 0,1%. Se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario (mouse antihuman IgE peroxidasa) diluido 1/5000 durante 1 hora. Se realizó el revelado de las membranas utilizando el método ECL (GE Healthcare).

### **3.10.5.1. Ensayo de inmunodetección con filtro Air Sentinel.**

Las muestras recogidas por las membranas de politetrafluoretileno colocadas en el filtro automático de partículas de tipo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota) fueron procesadas.

Las proteínas se extrajeron incubando la membrana en PBS durante toda la noche a 4°C. Para eliminar impurezas recogidas en la membrana se precipitó la muestra con acetona. Se añadieron seis volúmenes de acetona a la muestra, mezclándose con vortex y guardándolas durante 30 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm en una microfuga de mesa durante 30 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante, se suspendió el precipitado y se pasó por una columna de desalado (Protein Desalting Spin Columns, Thermo).

Se realizó una cuantificación de proteínas del extracto resultante mediante el método de Bradford<sup>136</sup>, tal como se ha descrito anteriormente.

### **3.10.6. Ensayos de reactividad cruzada mediante técnicas de inhibición (Inmunoblot-inhibición).**

Para los distintos ensayos de inhibición realizados se utilizaron varias muestras de pool de sueros sin diluir de pacientes alérgicos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), las cuales se pre-incubaron a una concentración de inhibidor de 100µg/ml usando los distintos extractos de fuentes alergénicas según cada ensayo y 500µg/ml cuando se usó la proteína recombinante obtenida por clonación. En todos los casos las incubaciones se realizaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Se utilizó en cada ensayo suero inhidido con BSA (albúmina sérica bovina) como control negativo de inhibición y suero no atópico.

## **3.11. Estudios de Proteómica.**

### **3.11.1. Identificación de proteínas alergénicas mediante espectrometría de masas.**

La identificación de proteínas por espectrometría de bandas se realizó en la Unidad de Proteómica de la Facultad de Farmacia (UCM), miembro de ProteoRed. Las bandas que se deseaban identificar se cortaron del gel de poliacrilamida con un bisturí estéril y se digirieron con tripsina según el método de Shevchenko *et al*<sup>139</sup>. Las proteínas digeridas en el gel fueron purificadas según el método descrito por Gobom *et al*<sup>140</sup>.

Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA). El espectrómetro fue calibrado a la masa teórica de  $\pm 50$  ppm. Los espectros obtenidos se analizaron informáticamente para la identificación de las distintas proteínas.

Se intentó identificar las proteínas mediante la fragmentación de los péptidos internos de las mismas, utilizando un electrospray como fuente de ionización y un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS).

La identificación se realizó buscando las secuencias no redundantes en una base de datos (NCBI) utilizando el programa Mascot. Se utilizó una tolerancia de la masa monoisotópica

menor a 50 ppm, permitiendo la falta de una escisión de la enzima de restricción. Entre las modificaciones permitidas se encuentran la carbamidometilación de las cisteínas (modificación fija) y la oxidación de las metioninas (modificación variable).

### **3.11.2. Clonación, purificación y expresión del alérgeno del hámster Siberiano.**

#### ***a.- Extracción de ARN.***

##### Materiales:

RNAlater® (Invitrogen, AM7020)

Purelink® RNA Mini Kit (Invitrogen, 12183020)

El personal veterinario procedió a la extracción de glándulas salivales de 2 hámsteres Siberianos, que fueron obtenidas como se ha descrito anteriormente. A partir de dicha muestra de tejido (glándula salival), suministrada y preservada en el reactivo RNAlater®, se extrajo el ARN mediante homogenización mecánica, y se purificó utilizando el producto PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen).

#### ***b.- Generación de cDNA y del gen del alérgeno de hámster Siberiano mediante PCR.***

MAO329 (Forward, 5'-TATCGGATCCGAAYGAYTAYGCGARYTGARCC-3')

Wobbles: R=A+G; Y=C+T; = inosina (aparea con A, G, C ó T).

MAO330 (Reverse, 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')

MAO331 (Reverse, 5'-CTTGGTACCTTTTTTTTTTTTTTTT-3')

##### Cebadores de secuenciación:

T7 Fwd (Forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3')

T3 (Reverse, 5'-AATTAACCCTCACTAAGGG-3')

Cepa DH5α de *Escherichia coli*

Vector de clonación pBluescript SK (+) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/58067>)

A partir de una alícuota del RNA extraído se procedió a sintetizar la cadena complementaria del mRNA utilizando el producto SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y el cebador MAO330.

Se amplificó el cDNA utilizando *Taq* polimerasa (Biomedal) y los cebadores MAO329 (con secuencia degenerada, diseñado a partir de la secuencia peptídica N-terminal NDYAELEG) y MAO331, según el siguiente programa: 95°C 5' → [95°C, 30" → X°C, 30" → 72°C, 2"] x30 → 72°C, 10' donde X correspondió a una temperatura de annealing comprendida en un gradiente de 40°C a 65°C (12 reacciones independientes).

### **c.- Construcción de pBluescript-PhoS-n.**

#### **1.- Digestión (temperatura, enzimas de restricción, buffers utilizados en todo el proceso):**

Digestión pBluescript SK+ para clonación de las Open Reading frames (ORF) (provenientes de reacciones en paralelo).

Se partió del siguiente material:

- pBluescript(SK)+
- *EcoRV*, 10 U/ $\mu$ l, Bioron.
- 10X buffer *EcoRV*, Bioron.

Se incubó 1.5 horas a 37°C.

#### **2.- Purificación de las digestiones y fragmento de PCR.**

Se recortó en gel la banda correspondiente al fragmento digerido y se purifica utilizando el *AccuPrep® Gel Purification Kit* (BIONEER).

#### **3.- Ligación.**

Se prepararon las siguientes mezclas de ligación:

	<b>LIG</b>	<b>Control Vector</b>
<b>Fragmento PCR</b>	5 $\mu$ l	-
<b>pBluescript-EcoRV-purific</b>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>10x buffer de ligación</b>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O mq</b>	3 $\mu$ l	8 $\mu$ l
<b>Ligasa</b>	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
<b>V<sub>F</sub></b>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Se utilizó ligasa a 5 U/ $\mu$ l (ROCHE,) y 10x buffer de ligación (ROCHE). Se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

#### **4.- Transformación.**

Se transformó por choque térmico la cepa de *E. Coli* DH5 $\alpha$  con el producto de las ligaciones.

Se mezclaron 50  $\mu$ l de células competentes (stock almacenado a -80°C, y depositadas en hielo hasta su descongelación, todo el proceso en frío) con 2  $\mu$ l de ligación. A continuación:

- Incubar en hielo 30 min.
- Dar choque térmico en baño de agua a 42°C, 45".
- Incubar 2 min en hielo.
- Añadir 850  $\mu$ l de medio LB.
- Incubar 1 h a 37°C (agitación).

- Sembrar en placa (centrifugar las células para obtener un pellet, resuspenderlo en 100 µl). Se sembró en placas de LB-Agar + ampicilina (100 µg/ml) + X-gal (30 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C.

#### ***d.- Secuenciación.***

##### Cebadores de secuenciación:

T7 Fwd (Forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3')  
T3 (Reverse, 5'-AATTAACCCTCACTAAGGG-3')  
MAO049 (Forward, 5'-CCCTTAGGCTTTATG-3')  
MAO050 (Reverse, 5'-GAGCGTTCTAACAAAT-3')

#### ***e. Clonación del vector de expresión mediante PCR.***

##### Cebadores de la clonación

MAO334 (Forward, 5'-AGCATGCTCAATGACTATGCGGAGC-3')  
MAO335 (Reverse, 5'-ATTAAGCTTAGTGATGGTGGTGATGAT  
GACCAGAGCCTTTTAGGACAAGTATC-3')

##### Cepas de *E. Coli* y vector de expresión

Cepa DH5α de *E. coli*  
Cepa hospedadora T7/Cascade BL21 (DE3)4D2 de *E. coli* (Biomedal).  
Vector de expresión T7/Cascade pMAB36 (Biomedal).

##### Cultivo e inducción de la expresión

Estreptomicina: Acofarma.  
Kanamicina: Applichem.  
Salicilato sódico: Alfa aesar.  
Acido Benzoico: Acros.  
IPTG: Bioron.

Usando los cebadores MAO334 y MAO335, y como DNA molde de construcción pBluescript-PhoS-181 obtenido antes, se amplificó mediante PCR un producto de 499 pb digerido con las enzimas *SphI* y *HindI* y clonado entre las mismas dianas del vector pMAB36.

#### **1.- PCR colonias.**

Se escogió una serie de colonias blancas (se descartan las azules) para analizar por PCR. Para ello, se utilizaron los primers T7 (Fwd) y T3 (Rev). El producto esperado para un clon positivo es de unos 700 pb (frente a 165 pb de un clon negativo).

PCR mix (32 reacciones de 50 µl):

H <sub>2</sub> O	1144 µl
25 mM acetato magnésico	128 µl
10 mM dNTP	128 µl
10x Taq buffer	160 µl
100 µM T7	16 µl
100 µM T3	16 µl
Taq polymerase	8 µl
Vol final	1600µl

Programa de PCR:

passo	Temp	duración
1.	95°C	5 min
2.	95°C	30''
3.	45°C	30''
4.	72°C	1 min
5.	72°C	10 min

(Se incluye un clon de positivo de alrededor de 500 pb).

## **2.- Miniprep**

Se prepararon cultivos de 20 ml en LB + ampicilina (100 µg/ml). Se incubó a 37°C hasta saturación.

Se prepararon tres minipreps de 4 ml cada una, por cada clon positivo, utilizando el *AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit* (BIONEER). El DNA se eluyó con agua mq.

## **3.- Cuantificación.**

El DNA se cuantificó por absorbancia a 260 nm (Nanodrop, Thermo scientific); y en electroforesis en gel de agarosa (estimación en función a patrón).

Se mandaron 5 µg (mínimo 1 µg/reacción) de cada construcción a secuenciar (STAB VIDA) con T7 Fwd y T3.

## ***f.- Construcción de pMAB36-PhoS-181-6xHis.***

### **1.- PCR.**

Se amplificó por PCR el inserto a partir del molde pBluescript-PhoS-181, Platinum®*Pfx* DNA Polymerase. Invitrogen.



PCR mix (para 4 reacciones independientes, se usarán:

H <sub>2</sub> O	130.4 μl
10x PCR buffer	30 μl
10 mM dNTP	6 μl
50 mM MgSO <sub>4</sub>	4 μl
100 μM primer forward	0.5 μl
100 μM primer reverse	0.5 μl
pBluescript-PhoS-181 (300 ng/μl)	1 μl
10X PCR enhancer	20 μl
<i>Pfx</i> polimerasa (2.5 U/μl)	1.6 μl
Vf	200 μl

Programa de PCR:

paso	Temp	duración
1.	94°C	5 min
2.	94°C	15''
3.	60°C	30''
4.	68°C	30''
5.	68°C	10 in

Se realizaron las digestiones, ligación, transformación, PCR de colonias y una Miniprep del vector del molde pBluescript-PhoS-181, tal como se comentó en los pasos anteriores.

### ***g.- Expresión.***

Una vez verificada la presencia de la fusión PhoS-6xHis en la fracción soluble de los cultivos, se llevó a cabo un ensayo de purificación de la proteína recombinante a partir del cultivo inducido a 20° C con 1 mM salicilato + 10 mM 3-metilbenzoato. Ello se obtuvo de la fracción soluble las células de 50 ml de dicho cultivo, recogidas y resuspendidas en el mismo volumen de PBS ph 8.0.

La fracción soluble se aplicó a una columna con 0,5 ml de resina IMAC “His-Select ® Nickel Affinity” (SIGMA) equilibrada con buffer de volúmenes de columna del mismo buffer y la proteína retenida se eluyó en fracciones de 1 ml con buffer de elución (20 mM de fosfato potásico ph 8.0, 100 mM NaCL) con concentraciones crecientes de imidazol: 25 mM (E1), 50 mM (E2), 75 mM (E3), 100 mM (E4), 125 mM (E5), 150 mM (E6), 200 mM (E7), 250 mM (E8), 300 mM (E9) y 500 mM (E10). Se analizaron 15 μl de cada fracción de elución mediante 15% SDS-PAGE/ EZ Blue y Western blot con anticuerpo anti-6xHis.

#### ***h.- Escalado de la expresión y purificación.***

A partir de un transformante de la cepa BL21 (DE3) 4S2 con el plásmido pMABB36-PhoS-181-6xHis-49 seleccionado en medio LB+25 mg kanamicina /l + 50 mg de estreptomicina /l, se inoculó un cultivo de 1000 ml en medio TB + 50 mg de estreptomicina /l que se incubó a 37°C y 200 rpm en un matraz de 5000 ml de capacidad, hasta que alcanzó un D.O.<sub>600nm</sub> =0.77. En este punto se reparó una alícuota de 10 ml de capacidad en un matraz de 50 ml de capacidad (cultivo de control no inducido). Al resto del cultivo se le añadieron los inductores del sistema *Cascade* (1 mM salicilato + 10 mM 3-metibenzoato), y se continuaron incubando a 20°C durante toda la noche.

Al final de cada incubación se recogieron las células de 1 ml de cada cultivo, que se resuspendieron e hirvieron en un volumen de SB1X (sample buffer) proporcional a la D.O.<sub>600nm</sub> final alcanzada, (14.2 cultivo no inducido, NI; 2.1 cultivo inducido, I). Se analizaron 5 µl de cada muestra mediante SDS-PAGE al 15% y tinción con reactivo EZBlue.

#### ***i.- Purificación mediante IMAC de la proteína Pho s de Phodopus sungorus.***

##### Cultivo e inducción de la expresión

**Estreptomicina:** Acofarma.

**Kanamicina:** Applichem.

**Salicilato sódico:** Alfa Aesar.

**Ácido Benzoico:** Acros.

##### Purificación, análisis mediante SDS-PAGE y Western blot

Tris: Scharlau.

SDS: GE.

Marcadores de tamaños moleculares: Precision Plus Protein Standards All Blue, Bio-Rad.

EZ/Blue: SIGMA, G1041.

Resina High density Nickel: ABT.

Imidazol: Scharlau.

NaCl: Quality chemicals.

Para la purificación de la proteína recombinante, las células del cultivo recogidas mediante centrifugación se resuspendieron en 40 ml de PBS ph 8.0 y se lisaron utilizando un homgenizador GEA Niro, modelo NS1001L PANDA a una sobrenadante (fracción soluble, FS). La fracción soluble obtenida se aplicó a 15 ml de resina High density Nickel (ABT) equilibrada con 4 volúmenes de columna de buffer de equilibrio/lavado (400 mM NaCl+ 5 mM imidazol + 20 mM fosfato potásico, ph 8.0), a un flujo de 1 ml/min.

Tras lavar la resina con 12 volúmenes de columna del mismo buffer se llevó a cabo la elución de la proteína PhoS-6xHis en fracciones de 30 ml con buffer de elución (20 mM fosfato potásico ph 8.0, 100 mM NaCl) con concentraciones crecientes de imidazol: 25 mM imidazol (E1), 50 mM imidazol (E2), 75 mM imidazol (E3), 100 mM imidazol (E4), 125 mM imidazol (E5), 150 mM imidazol (E6), 200 mM imidazol (E7), 250 mM imidazol (E8), 300 mM imidazol (E10). Se analizaron 20 µl de cada fracción de elución mediante SDS-PAGE 15% EZBlue.

### **3.12. Estudios inmunológicos “in vitro” con la proteína recombinante de hámster Siberiano.**

#### **3.12.1. Ensayos mediante técnica de inmunoensayo ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”).**

Los ensayos se realizaron tapizando placas de 96 pocillos de poliestireno Immulon 4HBX (Thermo®) de fondo plano y alta capacidad de unión, realizándose cada uno de ellos por duplicado.

Las placas fueron tapizadas a una concentración de 100µg/ml de proteína según cada extracto estudiado, en un volumen de 100 µl de muestra por pocillo. Se utilizó PBS 1X como tampón de dilución en los pocillos de las muestras de proteínas y en los pocillos control. Las incubaciones fueron realizadas a 4°C durante toda la noche. Los lavados se realizaron utilizando PBS-Tween 0,05% con volúmenes de 200µl por cada pocillo y por cada lavado.

Tras los lavados, los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados incubando las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, con 200 µl de tampón de bloqueo de ELISA. A continuación las placas se incubaron en una estufa a 37°C, con los sueros de los pacientes diluidos al 1/10 en solución de bloqueo durante 2 horas.

Tras repetir los lavados con PBS-Tween 0’05% se realizó una incubación de una hora con 100µl por pocillo de un anticuerpo policlonal secundario anti-IgE humana conjugado en peroxidasa obtenido de cabra ( $\alpha$ -antiIgE-GaHu-PO) a una dilución 1/2500. Tras repetir los lavados se revelaban las placas con Tetrametil Benzidina (TMB, sustrato ultrasensible, Chemicon).

Se realizó la lectura de cada placa mediante el aparato lector TECAN infinite F200, con el software “I-Control 1,6”, leyendo a una absorbancia de 620 nm.

#### **3.12.2. Ensayos mediante técnica de inhibición de inmunoensayo ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”).**

Los sueros de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) se preincubaron sin diluir durante 4 horas a temperatura ambiente con las fuentes alergénicas estudiadas. La cantidad de inhibidor utilizada fue de 100µg/µl de suero, salvo en el caso de la proteína recombinante que se inhibió a una concentración de 500µg/ml.

Transcurrido este tiempo, los sueros inhibidos se centrifugaron a 14.000 rpm en una centrífuga Heraeus Fresco 21 (Thermo Fisher) durante 5 minutos con la finalidad de eliminar los posibles inmunoprecipitados formados y se diluyeron 1/10 en tampón de bloqueo preparado previamente. Posteriormente se transfirieron a la placa, previamente tapizada y bloqueada, siguiendo el protocolo tal y como se ha descrito en el ELISA.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición obtenido frente a una concentración de inhibidor, el cual se calculó según la siguiente expresión:

$$\% \text{ inhibición} = 100 [1 - (\text{DO}_{\text{obs}} - \text{Dobla}) / (\text{DO}_{\text{max}} - \text{Dobla})]$$

DO<sub>obs</sub>: densidad óptica observada en presencia de inhibidor.

DO<sub>max</sub>: densidad óptica en ausencia de inhibidor.

DO<sub>bla</sub>: densidad óptica en ausencia del antígeno tapizado.

### 3.12.3. Test de activación de basófilos (TAB).

Se decidió realizar un Test de activación de basófilos (TAB)<sup>138</sup> mediante el kit comercial Basotest (BasoFlowEx test kit, Exbio). Se utilizó para ello sangre completa de un paciente alérgico a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y de un paciente no atópico como control negativo, quienes se expusieron a diluciones crecientes de la proteína clonada de este animal según indica el protocolo del kit. Ambas muestras fueron tratadas con los correspondientes fluorocromos y la lectura de los eventos fue realizada mediante citometría de flujo<sup>131</sup>.



# ***RESULTADOS***



## RESULTADOS

### 4.1. Estudios “in vivo”.

#### 4.1.1. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Del un total de 45 pacientes que tenían exposición a hámster (es) Siberiano (s) (*Phodopus sungorus*) en su domicilio, sólo 21 pacientes (46%) cumplieron con los requisitos de inclusión. Fueron excluidos los 24 pacientes (64%) restantes.

De los 21 pacientes incluidos 14 (66,67%) correspondieron a mujeres y 7 pacientes (33,33%) correspondieron a hombres (**Fig. 3**).



Fig. 3. Sexo de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano incluidos en el estudio.

La **edad media** global de los pacientes incluidos fue de **27,2 años** ( $\pm 10$ -46).

Sólo 6 pacientes (**28,57%**) incluidos eran **fumadores**.



#### 4.1.2. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

##### 4.1.2.1 Pruebas funcionales respiratorias.

A cada paciente se le realizó una determinación de la Fracción del Óxido Nítrico exhalado (FeNO), en el momento de la inclusión. A continuación, se realizó una espirometría basal (se escogió la mejor de las 3 maniobras realizadas) (**Tabla 2**).

P	E	S	FeNO	CVF	VEF <sub>1</sub>	VEF <sub>1</sub> /CVF
1	46	M	44	3,44 (91%)	2,66 (82%)	77%
2	43	M	40	3,24 (85%)	2,45 (74%)	75%
3	27	M	42	3,88 (88%)	2,76 (76%)	71%
4	14	H	34	2,02 (90%)	1,89 (81%)	93%
5	42	M	46	2,24 (86%)	1,76 (85%)	78%
6	10	M	31	2,48 (89%)	1,75 (73%)	70%
7	43	M	85	2,78 (85%)	1,90 (68%)	68%
8	17	H	36	2,96 (109%)	2,92 (104%)	95%
9	12	H	42	2,88 (95%)	2,45 (75%)	85%
10	27	H	35	2,61 (75%)	2,15 (71%)	82%
11	33	M	51	2,89 (113%)	2,77 (104%)	96%
12	23	M	38	3,35 (92%)	3,66 (93%)	91%
13	33	M	76	2,27 (75%)	1,93 (85%)	85%
14	42	M	77	2,92 (82%)	2,23 (70%)	82%
15	12	H	51	2,45 112%	2,35 (84%)	94%
16	12	M	44	2,16 (77%)	1,68 (70%)	77%
17	11	M	45	5,26 (97%)	3,36 (74%)	63%
18	27	H	65	2,87 (72%)	2,44 (71%)	85%
19	41	M	43	2,47 (75%)	1,96 (69%)	79%
20	39	M	54	2,45 (78%)	2,02 (70%)	82%
21	18	H	61	1,18 (78%)	0,89 (58%)	66%

**Tabla 2. Pruebas funcionales respiratorias en pacientes alérgicos a hámster Siberiano en el momento de la inclusión en el estudio.** P: paciente. E: edad. S: sexo (H: hombre, M: mujer).

**FeNO:** fracción exhalada de Óxido Nítrico. **CVF:** capacidad vital forzada.

**VEF<sub>1</sub>:** volumen espiratorio forzado en el primer segundo. **VEF<sub>1</sub>/CVF:** cociente o Índice de Tiffeneau (>70% = normal).

#### 4.1.2.2. Síntomas y pruebas cutáneas generales.

Los resultados del estudio basal, tanto de síntomas, tiempo de latencia y pruebas cutáneas realizadas con los extractos comerciales de la batería de alérgenos comunes ambientales, extractos comerciales de animales y algunos roedores y la de los extractos nativos de las especies de hámsteres incluidos en el estudio aparecen resumidos a continuación (Tabla 3).

Estudio basal en el momento de inclusión								
P	E	S	síntomas	tiempo de latencia	pruebas cutáneas hámster Siberiano	otros hámsteres	otros animales	polinosis
1	46	M	Rc+A	8-12	p,s,o	Rob p,s, o	Perro	si
2	43	M	Rc+A	8-12	p,s,o	no	Perro	no
3	27	M	Rc	>12	p	no	Gato	no
4	14	H	Rc+A	4-8	p,s,o	Rob p,s,o	Conejo	si
5	42	M	Rc+A	4-8	p,s,o	no	Perro	si
6	10	M	Rc+A	4-8	p,s,o	no	caballo/gato	si
7	43	M	Rc+A	4-8	p,s,o	no	Gato	si
8	17	H	Rc	>12	p	no	Perro	si
9	12	H	Rc+A	4-8	p,s,o	Rob p,s,o	Cobaya	no
10	27	H	Rc+A	4-8	p,s,o	no	No	si
11	33	M	anafilaxia	<4	p,s,o	no	Gato	no
12	23	M	Rc+A	4-8	p,s,o	Rob p,s,o	Gato	no
13	33	M	Rc+A	<4	p,s,o	Rob p,s,o	Gato	no
14	42	M	Rc+A	8-12	p,s,o	no	Perro	si
15	12	H	Rc+A	<4	p,s,o	no	Conejo	no
16	12	M	Rc	>12	p	no	Gato	no
17	11	M	Rc	8-12	p,s,o	no	Gato	si
18	27	H	Rc	4-8	p,s,o	no	No	no
19	41	M	Rc+A	4-8	p,s,o	no	Gato	no
20	39	M	Rc+A	4-8	p,s,o	Rob p,s,o	No	no
21	18	H	Rc+A	4-8	p,s,o	Rob p,s,o	Gato	no

**Tabla 3. Clínica y pruebas cutáneas de pacientes alérgicos a hámster Siberiano.** P: paciente.

E: edad. S: sexo. RC: rinoconjuntivitis. A: asma. tiempo de latencia: medido en semanas.

Rob: hámster Roborowski. p: extracto de pelo. s: extracto de glándulas salivales. o: extracto de orina

#### 4.1.2.3. Análisis estadístico entre número de sensibilizaciones y Tiempo de latencia.

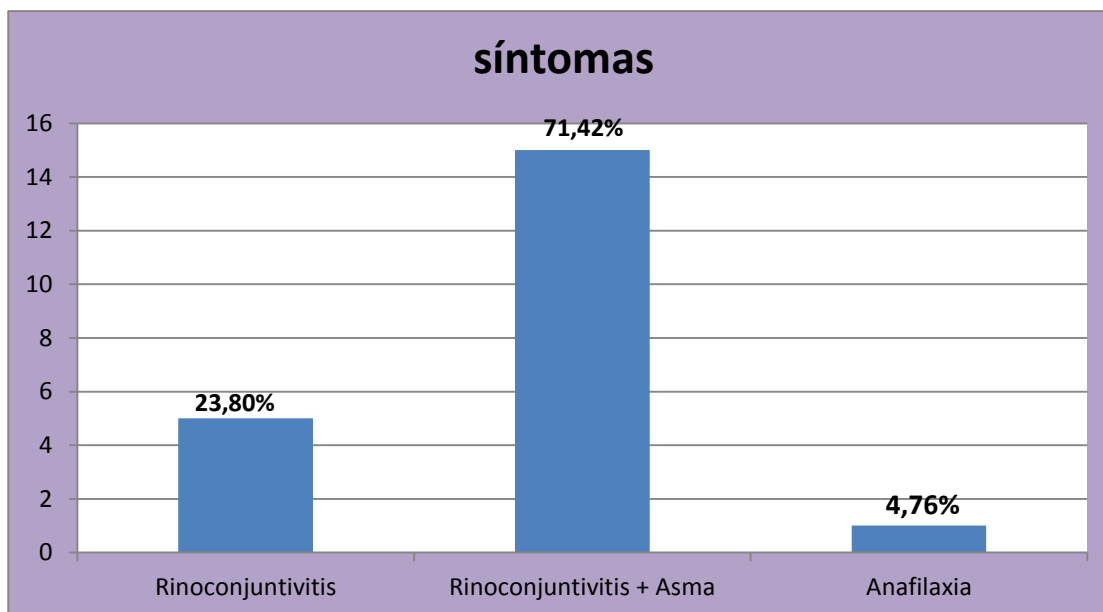
Se realizó una correlación entre el número de sensibilizaciones (cantidad de pruebas cutáneas positivas frente a los extractos (pelo, glándulas salivales y orina) de las distintas especies de hámsteres incluidas) que presentó cada paciente y el tiempo de latencia. Para evaluar esta asociación se utilizó la prueba de asociación de Fisher (**Tabla 4**).

Tiempo de latencia	Número de sensibilizaciones			
	1	3	6	Total
< 4 semanas	0 (0%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100%)
4-8 semanas	0 (0%)	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11 (100%)
8-12 semanas	0 (0%)	3 (75,0%)	1 (25%)	4 (100%)
>12 semanas	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
<b>Total</b>	3 (14,3%)	10 (47,6%)	8 (38,1%)	21 (100%)

**Tabla 4. Correlación entre el número de sensibilizaciones Vs tiempo de latencia.**  
Valor de p: 0.0073.

#### 4.1.2.4. Síntomas tras exposición a hámster Siberiano.

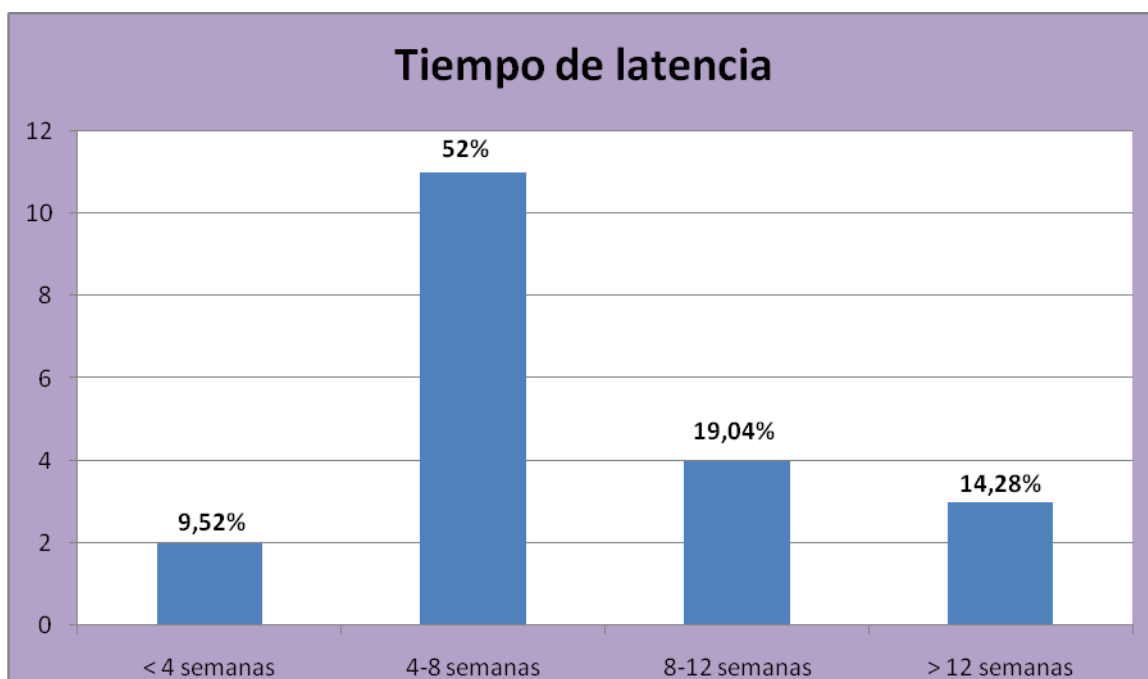
15 pacientes (71,42%) presentaron rinoconjuntivitis y asma, 5 (23,80) tuvieron sólo síntomas rinoconjuntivales. Hubo sólo 1 caso (4,76%) de anafilaxia por mordedura en un dedo de una mano por un hámster Siberiano en su domicilio (**Fig. 4**).



**Fig. 4. Síntomas presentados por los pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

#### 4.1.2.5. Tiempo de latencia.

11 pacientes (52%) presentaron un tiempo de latencia de entre 4-8 semanas, 4 pacientes (19,04%) entre 8-12 semanas, 3 pacientes (14,28%) más de 12 semanas y sólo 2 pacientes (9,52%) presentaron un tiempo de latencia menor a las 4 semanas (**Fig. 5**).



**Fig. 5. Tiempo de latencia pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

#### 4.1.2.6. Análisis estadístico entre Tiempo de latencia y probabilidad de síntomas.

Se realizó una correlación entre el Tiempo de latencia y la probabilidad de síntomas. Se consideró cada síntoma (rinoconjuntivitis, asma y/o anafilaxia) como entidades individuales. Se realizó una tabla de contingencia aplicándose la prueba de asociación de Chi-cuadrado (**Tabla 5**).

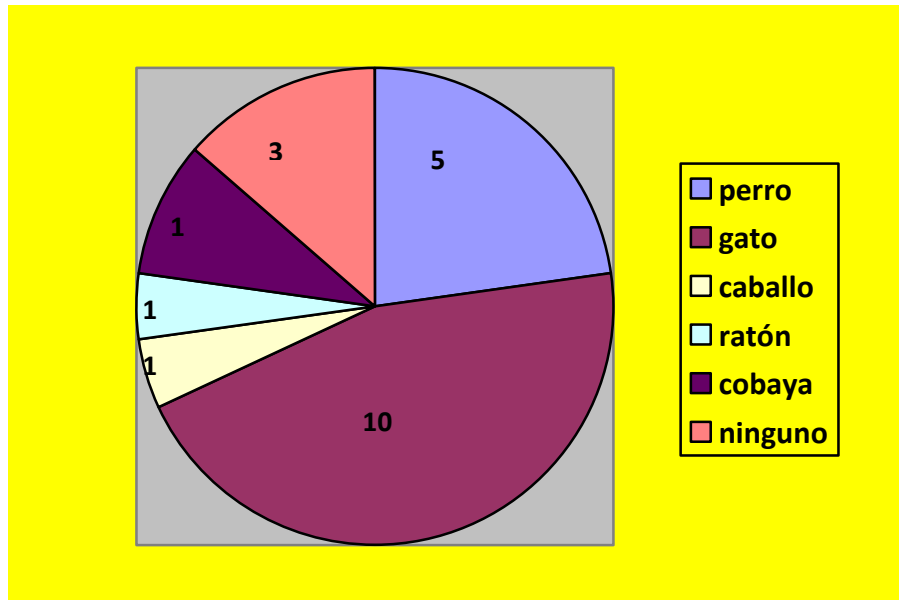
Tiempo de latencia	número de síntomas		
	1	2	Total
<4 semanas	1 (33,3%)	(66,7%)	3 (100%)
4-8 semanas	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11 (100%)
8-12 semanas	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
>12 semanas	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)

**Tabla 5. Correlación Tiempo de latencia Vs número de síntomas.**

Valor de p: < 0.05.

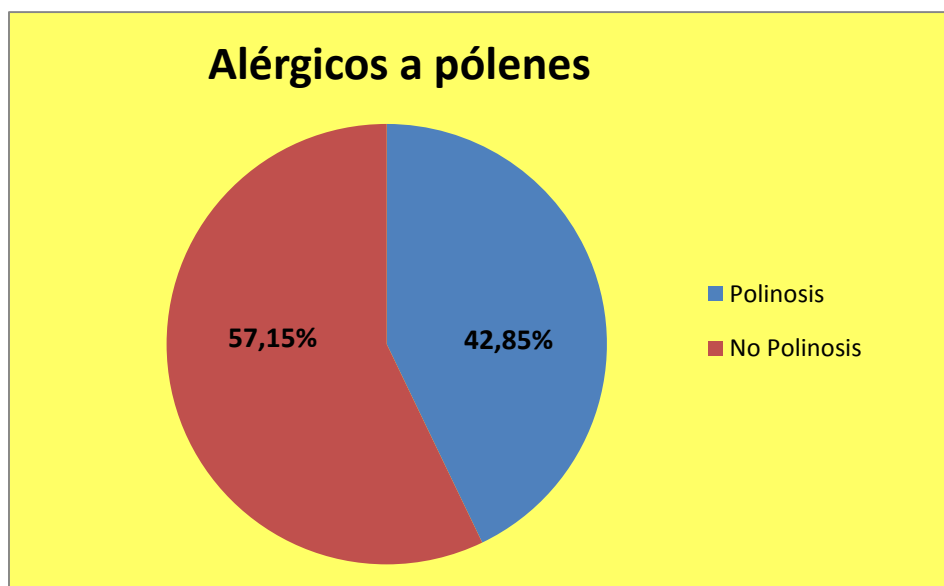
#### 4.1.2.7. Síntomas por exposición previa a otros animales.

18 pacientes (85,71%) habían tenido síntomas alérgicos por exposición previa a otros animales, siendo 5 pacientes (23,80%) alérgicos por exposición previa a perro, 10 pacientes (47,61%) alérgicos a epitelio de gato, 1 paciente (4,76%) alérgico a caballo, 1 paciente (4,76%) alérgico a ratón, 1 paciente (4,76%) alérgico a epitelio de cobaya. 3 pacientes (14,28%) no tenían antecedentes de ser alérgicos a otros animales por exposición previa en su domicilio (**Fig. 6**).



**Fig. 6.** Exposición previa a otros animales en los pacientes incluidos en el estudio.

De los pacientes incluidos, sólo 9 pacientes (43%) eran alérgicos a pólenes en el momento de la inclusión, mientras que los otros 12 pacientes (57,15%) no tenían síntomas de polinosis (**Fig. 7**).



**Fig.7.** Pacientes alérgicos y no alérgicos a pólenes incluidos en el estudio.

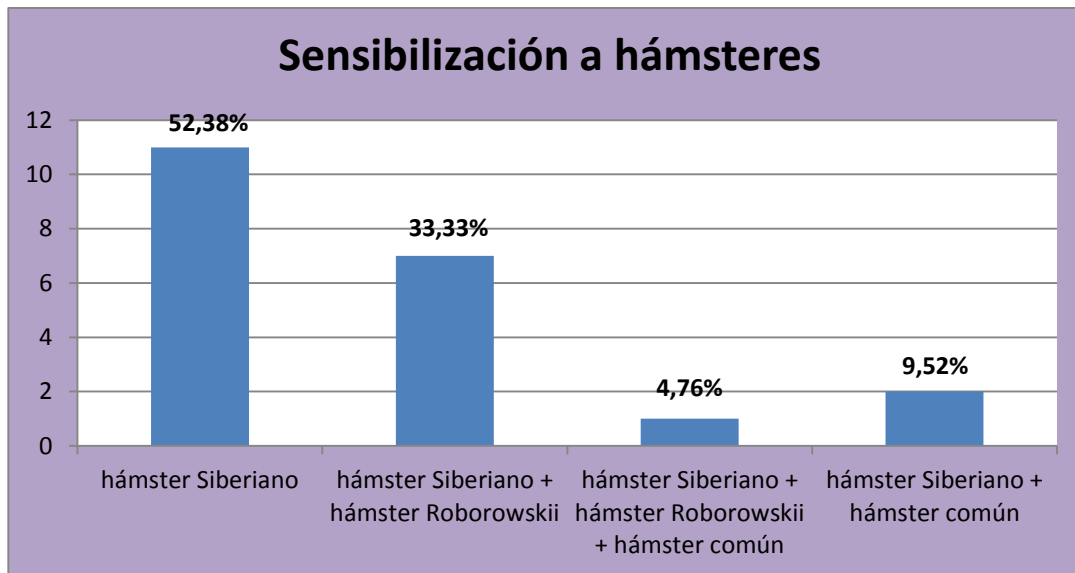
#### 4.1.2.8. Pruebas cutáneas con extractos de hámsteres.

Los 21 pacientes incluidos presentaron pruebas cutáneas positivas para los extractos de hámster Siberiano: 3 pacientes (14,28%) sólo resultaron estar sensibilizados al pelo, mientras que 18 pacientes (85,71%) lo estaban a los tres extractos alergénicos (pelo, glándulas salivales y orina). La media de diámetro de la pápula para las pruebas cutáneas para el extracto de pelo, glándulas salivales y de orina fue de 4 x 4 mm (**Tabla 6**). Los 5 pacientes utilizados como controles no atópicos presentaron un resultado negativo en todas las pruebas cutáneas realizadas con los extractos de hámsteres incluidos (< 3 mm).

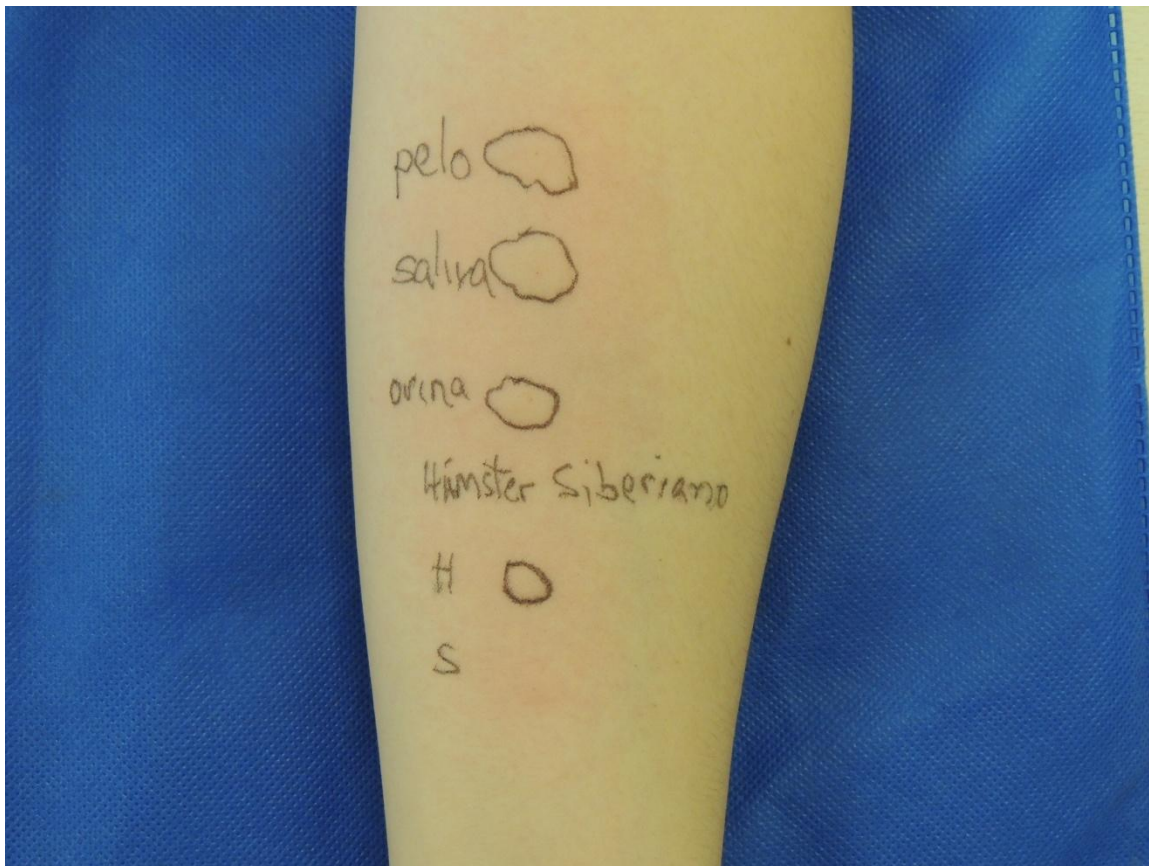
De los 21 pacientes incluidos en el estudio, 11 pacientes (52,38%) estaban sensibilizados sólo a hámster Siberiano, 7 (33,33%) estaban sensibilizados además a los extractos de pelo, glándulas salivales y de orina del hámster Roborowski. 1 paciente (4,76%) estaba sensibilizado a hámster Siberiano, hámster común y hámster Roborowski y 2 pacientes (9,52%) lo estaban a hámster Siberiano y a hámster común (**Tabla 6**) (**Fig. 8-9**).

H. Siberiano				H. común			H. dorado			H. Roborowski		
P	p	Gs	o	p	gs	O	p	gs	o	p	gs	o
1	4x5	4x4	3x3	0	0	0	0	0	0	3x3	0	0
2	4x4	3x4	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	4x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5x5	4x4	3x4	0	0	0	0	0	0	4x3	4x3	3x3
5	4x4	4x4	4x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3x3	4x3	4x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	4x4	5x4	4x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	4x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	4x4	4x4	4x3	0	0	0	0	0	0	3x3	3x4	3x3
10	4x4	4x3	4x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4x5	6x4	4x4	0	3x4	0	0	0	0	4x4	4x4	4x4
12	4x4	4x4	4x4	0	0	0	0	0	0	4x3	4x3	4x3
13	6x4	4x4	4x4	0	0	0	0	0	0	4x4	4x4	4x3
14	4x3	4x3	4x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	4x4	4x4	4x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	4x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	5x4	4x4	4x4	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0
18	4x5	4x3	4x3	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0
19	4x4	4x4	4x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	5x4	5x4	5x4	0	0	0	0	0	0	4x4	4x4	4x4
21	4x4	4x4	4x5	0	0	0	0	0	0	3x4	3x4	4x3

**Tabla 6. Pruebas cutáneas de pacientes alérgicos a hámster Siberiano con cada especie de hámster incluida, en el momento de la inclusión en el estudio. P: paciente. p: pelo. gs: glándulas salivales. o: orina**



**Fig. 8. Pacientes alérgicos a hámster Siberiano sensibilizados a hámster Siberiano y/u otras especies de hámsteres.**



**Fig. 9. Pruebas cutáneas con extractos nativos de hámster Siberiano en paciente alérgico a hámster Siberiano.**

#### 4.1.2.9. Determinación de IgE específica.

Se determinó la IgE específica por método de CAP-FEIA system®<sup>12</sup> (Phadia-Thermofisher), para epitelios de animales domésticos (perro, gato, vaca y caballo) y roedores (rata, ratón, cobaya, hurón y hámster común (*Cricetus cricetus*). Los valores < 0,35 kU/l fueron considerados negativos (**Tabla 7**).

Determinación de IgE específica frente a animales domésticos y roedores									
P	perro	gato	caballo	vaca	conejo	ratón	hurón	hámster	cobaya
1	0,15	0	0	0	0	0	0	0,38	0
2	3,09	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	5,12	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,23	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	2,31	4,15	0	0	0	0	0	0
7	0	6,65	0	0	0	0	0	0	0
8	4,87	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	3,40
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	4,23	0	0	0	0	0	1,05	0
12	0	1,11	0	0	0	2,15	0	0	0
13	0	0,29	0	0	0	0	0	0	0
14	2,32	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	3,09	0	0	0	0	0	0	0
17	0	1,23	0	0	0	0	0	0,40	2,15
18	0	0	0	0	0	0	0	1,05	0
19	0	1,78	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	11,34	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 7. Determinación de IgE específica (kU/l) frente a epitelios de animales y algunos roedores.**

Se determinó la IgE específica por método de CAP-FEIA system®<sup>12</sup> (Phadia-Thermofisher), para alérgenos recombinantes de gato: Fel d 1: uteroglobina, Fel d 2: albúmina sérica, Fel d 4: lipocalina; perro: Can f 1: lipocalina, Can f 2: lipocalina, Can f 3: albúmina sérica, Can f 5: kaliceína prostática de perro (DPK) y caballo: Equ c 1: lipocalina. Los valores < 0,35 kU/l fueron considerados negativos (**Tabla 8**).



Determinación de IgE específica de alérgenos recombinantes de perro, gato y caballo									
P	Exp pr	Fel d 1	Fel d 2	Fel d 4	Can f 1	Can f 2	Can f 3	Can f 5	Equ c 1
1	perro	0,01	0,02	0,04	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02
2	perro	0,04	0,08	0,05	2,37	0,04	1,04	0,05	0,02
3	gato	1,04	2,04	0,02	0,07	0,01	0,12	0,08	0,01
4	conejo	0,14	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,04	0,01
5	perro	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
6	caballo/gato	0,40	1,53	4,53	>100	0,14	3,38	0,90	18,7
7	gato	3,02	0,02	0,08	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
8	perro	0,07	0,02	0,04	2,01	0,01	0,00	0,01	0,01
9	cobaya	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,37	0,01
10	ninguno	0,01	0,02	0,04	0,02	0,01	0,03	0,02	0,00
11	gato	1,01	0,04	0,09	0,04	0,02	0,01	0,02	0,04
12	gato	2,35	3,30	0,07	0,01	0,02	1,10	0,01	0,02
13	gato	1,02	0,02	0,16	0,02	0,08	0,01	0,01	0,02
14	perro	0,21	0,04	0,04	1,03	0,02	0,03	0,01	0,04
15	conejo	1,10	0,05	0,06	0,03	0,02	0,02	0,01	0,6
16	gato	1,30	0,15	0,09	0,03	0,04	0,03	0,04	0,20
17	gato	7,45	0,06	0,00	0,69	0,00	0,04	0,08	0,09
18	ninguno	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
19	gato	1,94	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01
20	gato	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01
21	gato	4,73	2,40	0,45	0,22	0,12	0,04	0,77	4,46

**Tabla 8. Determinación de IgE específica de alérgenos (kU/l) recombinantes de perro, gato y caballo.** Exp pr: exposición y sensibilización previa a animales domésticos dentro de los hogares.

## 4.2. Pruebas de provocación específica.

### 4.2.1 Provocación nasal específica (PNE).

Se realizaron dos provocaciones nasales específicas (PNE) con extracto nativo de pelo de hámster Siberiano, a dos pacientes alérgicos a hámster Siberiano, que tenían en sus respectivos domicilios, con los que presentaban síntomas rinoconjuntivales.

Para ello se realizó una rinometría acústica (RA) basal a cada paciente tras instilación de suero salino 0'9% mediante spray nasal en los cornetes inferiores. Se empleó un rinómetro acústico Rhinometrics® SER 2100. Se realizó una titulación a punto final con el extracto nativo de pelo de hámster Siberiano, haciendo diluciones 1/1000, 1/100 y 1/10 respectivamente, con las que luego se hacían las instilaciones.

Con la dilución 1/1000 no hubo pápula, por lo que en ambos casos se comenzó con la dilución 1/100 del extracto de pelo de hámster Siberiano. Cada 15 minutos se hicieron RA y se anotaron los resultados de los síntomas presentados según una escala de valoración analógica de síntomas con los siguientes resultados: (**Tabla 9**) (**Fig. 9**).

Paciente	dilución 1/100	dilución 1/10	dilución 1/1
Paciente 1	prurito nasal	prurito nasal y ocular, congestión nasal	prurito nasal y ocular, congestión nasal, estornudos.
Paciente 2	prurito nasal	prurito nasal, estornudos	prurito nasal y ocular, congestión nasal, estornudos.

**Tabla 9. Puntuación de síntomas naso-oculares tras PNE con distintas diluciones de extracto de pelo de hámster Siberiano.**

Según la escala de valoración analógica de los síntomas naso-conjuntivales (prurito nasal, ocular, estornudos, congestión nasal, rinorrea, lagrimeo, eritema conjuntival), se llegó a alcanzar un valor de **3 puntos (severa)** tras la exposición a hámster Siberiano en ambos pacientes provocados.

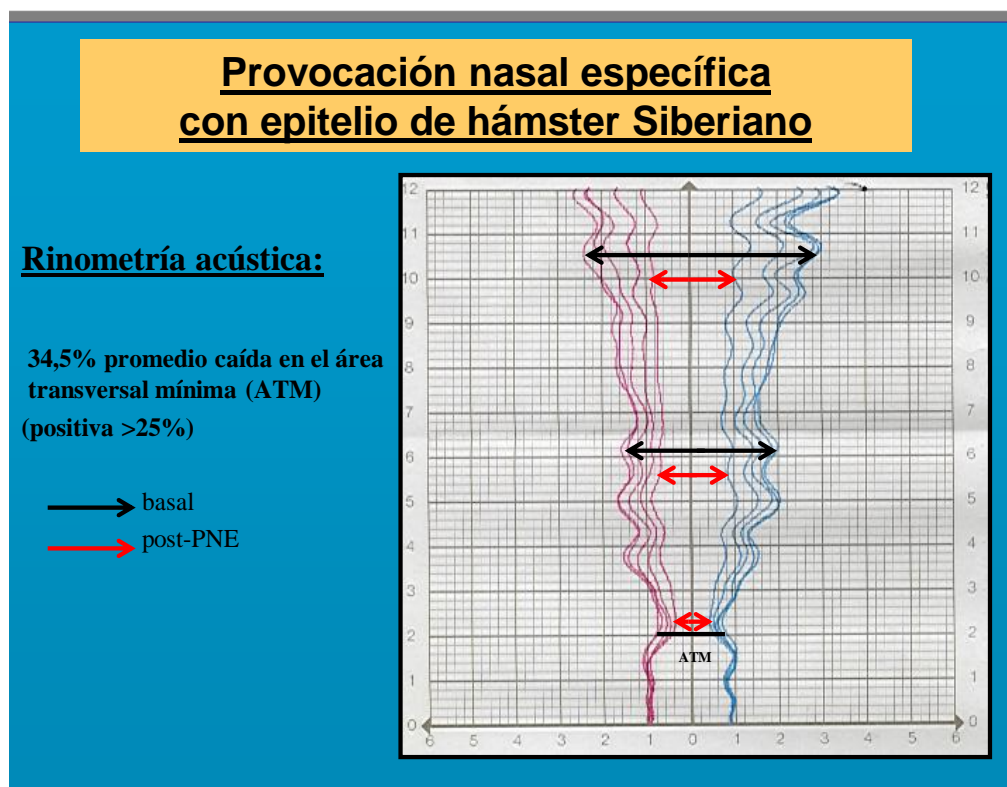
(score) 0: ningún síntoma

1: un síntoma = leve

2: dos síntomas = moderado

3: tres síntomas = severo.

En ambos casos la disminución del área transversal mínima fue mayor al 30% con respecto al valor basal, por lo que las PNE fueron consideradas **positivas (Fig. 10)**.



**Fig. 10. Rinometría acústica basal y post-PNE con extracto de pelo de hámster Siberiano en un paciente alérgico a hámster Siberiano.**

#### 4.2.2. Provocación bronquial específica (PBE).

**Paciente 1:** el primer día el test de provocación bronquial inespecífica (Test de metacolina) presentó una PC20: 0,25 mg/ml. (hiperreactividad bronquial moderada). La inducción de esputo basal reflejó la presencia de una eosinofilia en esputo de  $0,69 \times 10^6$ /ml. La medición del FeNO basal fue de 30 ppb (**Tabla 10**) (**Fig.11-13**).

Al día siguiente se realizó la PBE evidenciándose una caída brusca del FEV<sub>1</sub> de aproximadamente un 28% a los 20 minutos posteriores a la PBE, presentando una recuperación completa a los 40 minutos (20 minutos después de la caída del VEF<sub>1</sub>), que se mantuvo constante en las siguientes horas, tras realizar las mediciones horarias del VEF<sub>1</sub>, tal como se le indicó al paciente (**Fig. 14**).

La medición del FeNO post-PBE fue de 55 ppb, mientras que tras la PBE la eosinofilia en esputo pasó a ser de  $2,11 \times 10^6$ /ml (**Tabla 10**) (**Fig.12-13**).

La provocación bronquial inespecífica (Test de Metacolina) post-PBE reflejó una PC20: <0,125 mg/ml (hiperreactividad bronquial severa) (**Tabla 10**) (**Fig. 11**).

**Paciente 2:** la provocación bronquial inespecífica (Test de metacolina) basal presentó una PC20: 2,8 mg/ml (hiperreactividad bronquial leve). La medición del FeNO basal fue de 32 ppb, La inducción de esputo basal reflejó la presencia de una eosinofilia en esputo de  $0,35 \times 10^6$ /ml (**Tabla 10**) (**Fig. 11-13**).

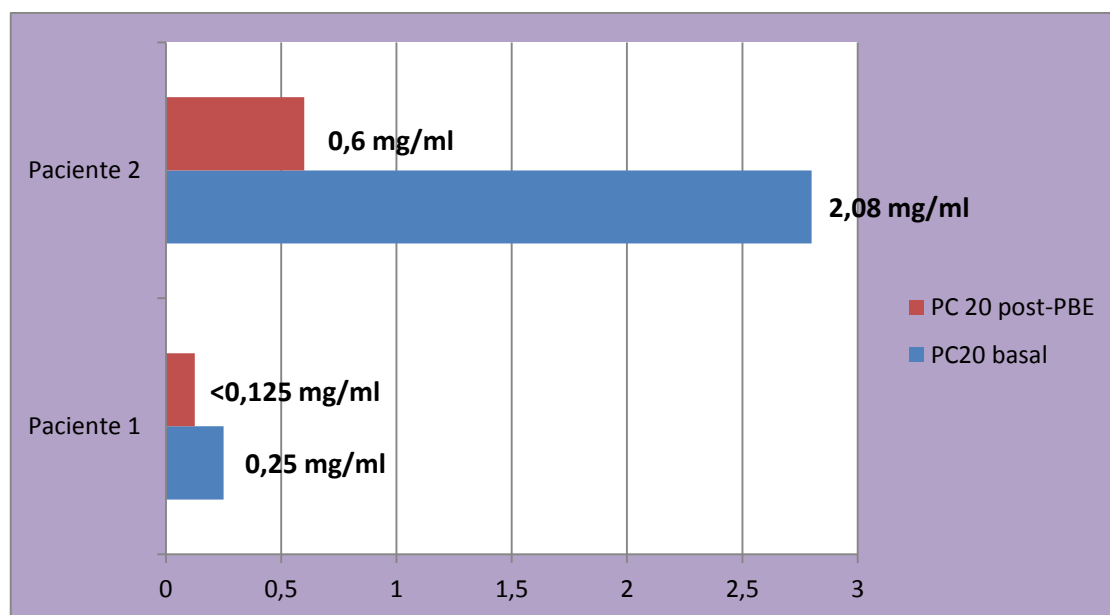
Al día siguiente tras realizarse la PBE se observó una caída del VEF<sub>1</sub> de aproximadamente un 20% a los 20 minutos posteriores a la PBE sin llegar a tener una recuperación completa hasta las 5 horas post-PBE, presentando posteriormente una respuesta tardía a las 8 horas posteriores a la PBE donde se observó una caída del VEF<sub>1</sub> de aproximadamente un 27% a las 11 horas post-PBE, presentando una recuperación completa del VEF<sub>1</sub> entre 2 a 3 horas después de la caída tardía del VEF<sub>1</sub> (**Fig. 14**).

La medición del FeNO post-PBE fue de 45 ppb, mientras que tras la PBE la eosinofilia en esputo pasó a ser de  $2,02 \times 10^6$ /ml (**Tabla 10**) (**Fig. 12-13**).

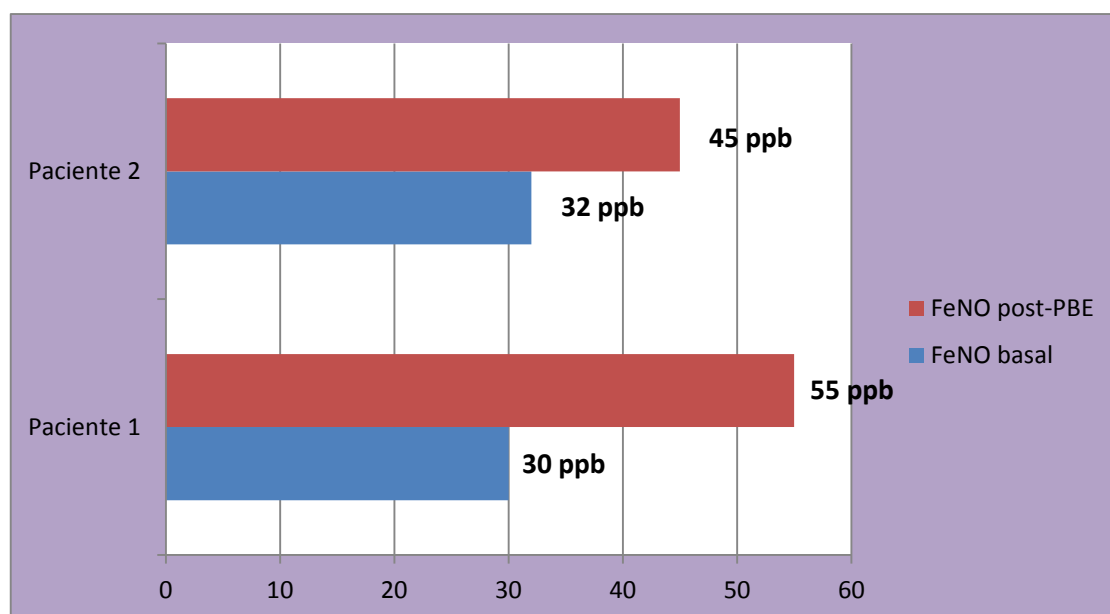
La provocación bronquial inespecífica (Test de Metacolina) post-PBE reflejó una PC20: 0,6 mg/ml (hiperreactividad bronquial moderada) (**Tabla 10**) (**Fig. 11**).

Paciente 1			Paciente 2		
Pre	Post		Pre	Post	
PC20	0,25 mg/ml	<0,125 mg/ml	PC20	2,8 mg/ml	0,6 mg/ml
FeNO	30 ppb	55 ppb	FeNO	32 ppb	45 ppb
eosinófilos esputo	$0,69 \times 10^6$	$2,11 \times 10^6$	eosinófilos esputo	$0,35 \times 10^6$	$2 \times 10^6$

**Tabla 10. Resultados pruebas realizadas en pacientes alérgicos a hámster Siberiano con provocación bronquial específica a pelo de hámster Siberiano.**



**Fig. 11. PC20 basal y post-PBE en pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**



**Fig. 12. Medición de FeNO basal y post-PBE en pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

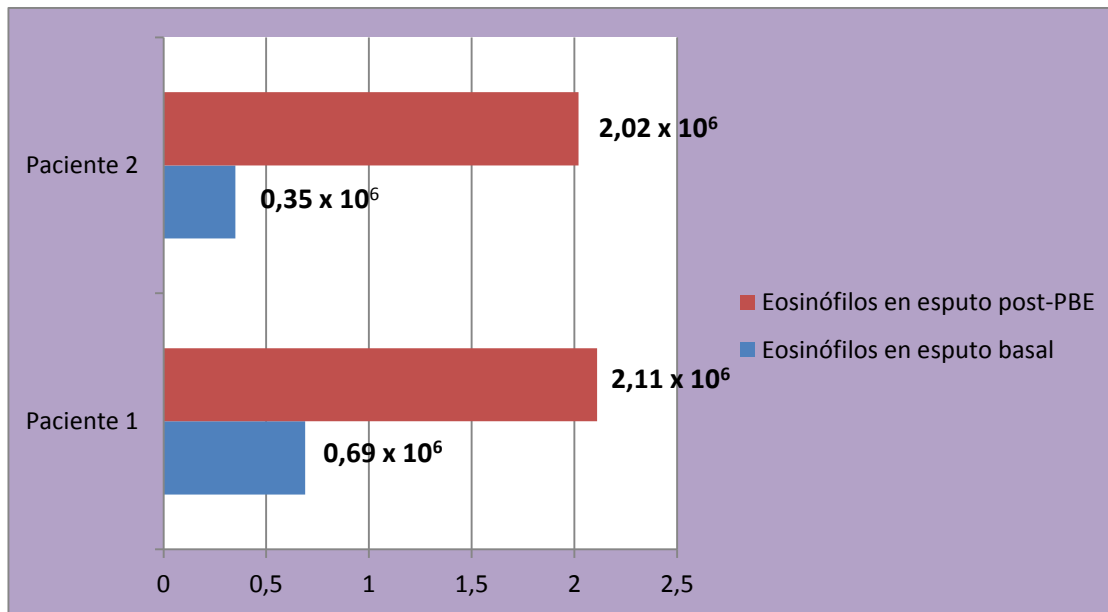


Fig. 13. Medición de eosinófilos en esputo basal y post-PBE en pacientes alérgicos a hámster Siberiano.

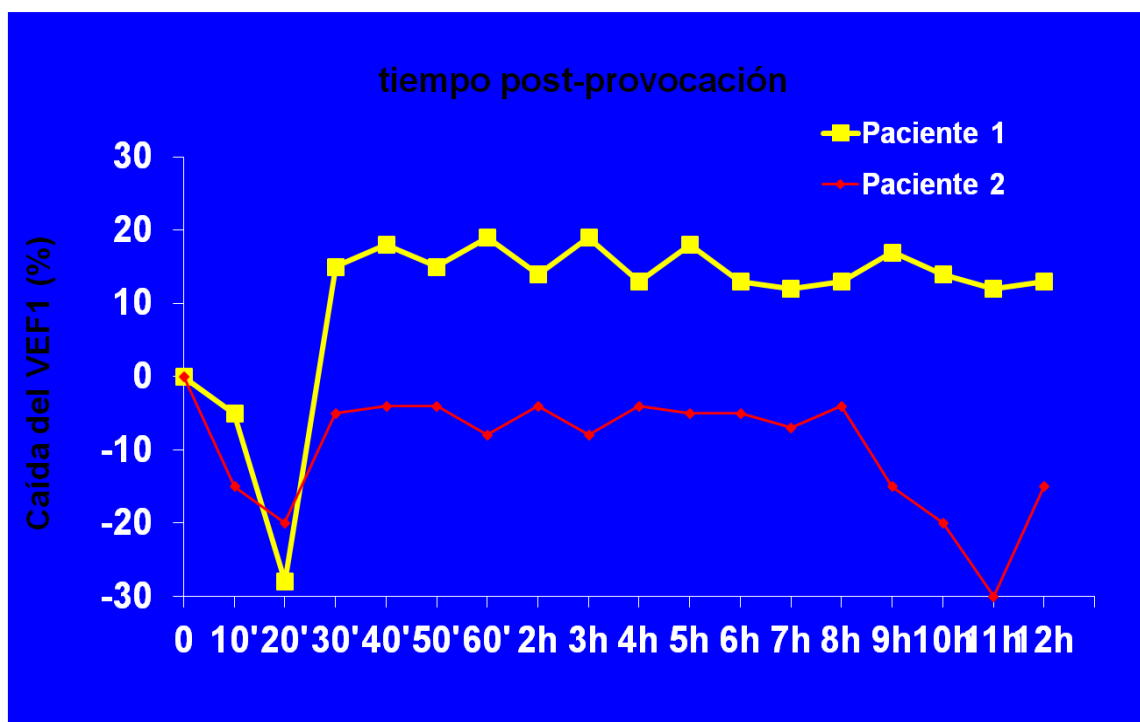


Fig. 14. Provocaciones bronquiales (PBE) en 2 pacientes alérgicos a hámster Siberiano y seguimiento  $VEF_1$  post-PBE con epitelio de hámster Siberiano.

### 4.2.3. Test de exposición controlada con hámsteres Siberianos.

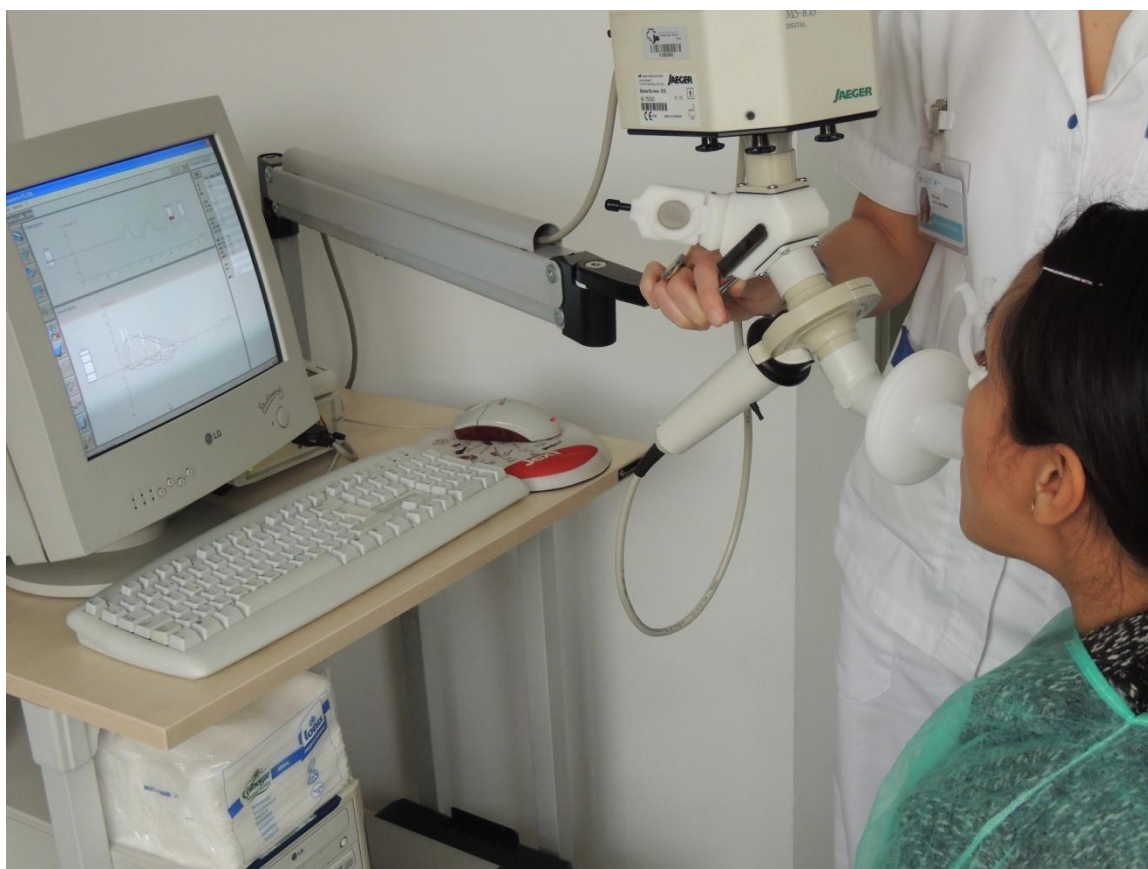
#### *Día 1º*

Se citó a una paciente de 32 años de edad, no polínica, bióloga. Tenía antecedentes de rinoconjuntivitis y asma alérgica por sensibilización a hámster Siberiano que había tenido durante unos meses en su domicilio. En el momento de la prueba llevaba varios meses sin exposición a hámster Siberiano, tras haberlos retirado de su domicilio siguiendo el consejo dado en la consulta de Alergia meses antes cuando fue incluida en el estudio.

Utilizaba salbutamol inhalado MDI 200 µg a demanda al presentar síntomas de asma cuando se exponía a ratas en el laboratorio de investigación donde trabajaba. Se encontraba sin medicación en esos momentos. Se le extrajo una muestra de sangre que fue posteriormente centrifugada y almacenada a -20°C para su posterior uso en pruebas “*in vitro*”.

Se realizaron las siguientes pruebas (**Fig. 15**):

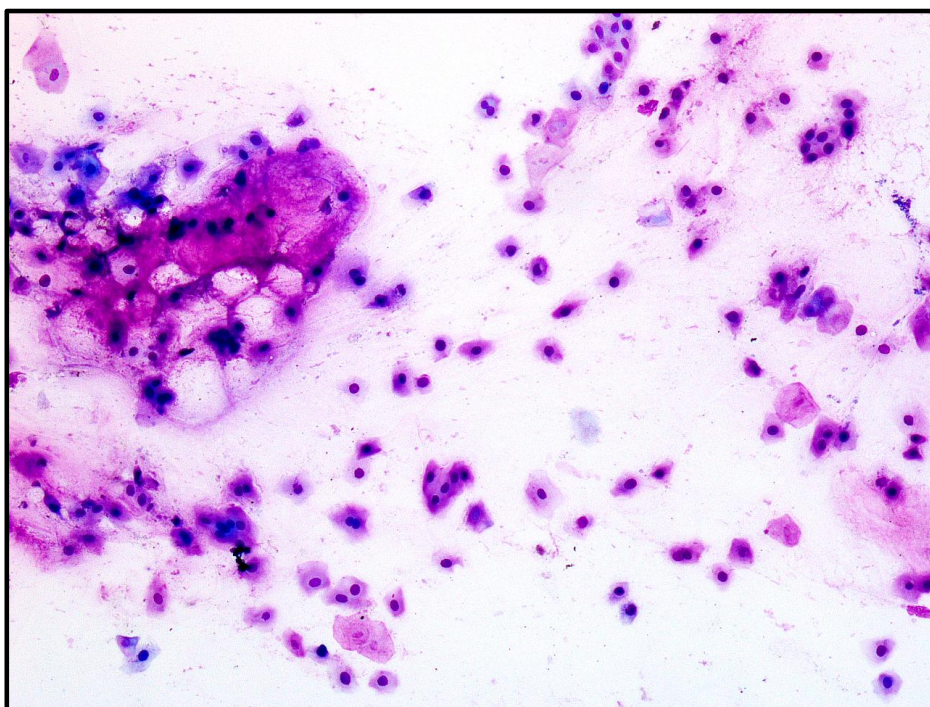
- 1) **Determinación de FeNO:** 39 ppb.
- 2) **Espirometría basal:** FVC: 3,52 (104%) FEV<sub>1</sub>: 2,63 (84%) FEV<sub>1</sub>/FVC: 74%.



**Fig. 15. Realización de espirometría en paciente alérgica a hámster Siberiano realizándose Test de exposición a hámster Siberiano.**



### 3) Citología nasal:



**Fig. 16. Citología nasal basal en paciente alérgica a hámster Siberiano. 10X.**

Tras tinción con Giemsa y fijación al portaobjetos con citospray, se visualiza con microscopía óptica con un aumento 10X un importante infiltrado de células escamosas nucleadas, algún eosinófilo aislado y algunas células caliciformes propias de un epitelio de mucosa nasal normal (**Fig. 16**).

**4) Celularidad en esputo basal:** tras inducción con suero salino hipertónico, se extrajo una muestra de esputo, que fue procesada en el Laboratorio de Inmunología. Posteriormente se determinó la celularidad de la muestra mediante el empleo de citometría flujo, obteniéndose los siguientes resultados: (**Tabla 11**).

Población	% visibilidad	eventos/ $\mu$ l
neutrófilos	17,92	59,78
eosinófilos	5,87	19,59
macrófagos	25,75	85,91
linfocitos totales	38,70	129,11
linfocitos T	35,09	117,05
linfocitos B	3,61	12,06
precursores eosinófilos	1,81	6,03
basófilos	9,94	33,16

**Tabla 11. Celularidad en esputo basal en paciente alérgica a hámster Siberiano.**

**5) Pruebas cutáneas:** se realizaron con la batería comercial de epitelios de animales y con los distintos extractos de pelo, saliva y orina de las cuatro especies de hámsteres incluidas en el estudio con los siguientes resultados: (**Tabla 12**)

extracto	resultado prick test (mm)
perro	0
gato	0
caballo	0
vaca	0
ratón	0
rata	4x4
conejo	0
cobaya	3x3
hámster Siberiano (pelo)	6x5
hámster Siberiano (g. salivales)	5x5
hámster Siberiano (orina)	4x5
hámster común (pelo)	0
hámster común (g. salivales)	0
hámster común (orina)	0
hámster dorado (pelo)	0
hámster dorado (g. salivales)	0
hámster dorado (orina)	0
hámster Roborovski (pelo)	3x3
hámster Roborovski (g. salivales)	5x5
hámster Roborovski (orina)	4x4

**Tabla 12. Pruebas cutáneas realizadas a paciente alérgica a hámster Siberiano sometida a Test de exposición a hámster Siberiano.**

**6) Rinometría Acústica (RA):** se realizó una RA basal obteniéndose los siguientes resultados: (**Tablas 13**) (**Fig. 17**).

Paciente	ATM cm <sup>2</sup>	Volumen cm <sup>3</sup>
fosa nasal derecha	0,48	1,57
fosa nasal izquierda	0,34	1,13

**Tabla 13. Resultados de RA basal en paciente alérgica a hámster Siberiano.**





**Fig. 17. Realización de Rinometría Acústica en paciente alérgica a hámster Siberiano realizándose Test de exposición a hámster Siberiano.**

**7) Provocación bronquial inespecífica (Test de metacolina).** Se realizó mediante el método “volumen corriente”. Se realizó una espirometría basal y posteriormente otra espirometría tras inhalación durante 2 minutos de suero salino isotónico 0’9% utilizado como diluyente, anotándose el valor obtenido del VEF<sub>1</sub> en litros (L). A continuación, se realizaron las mediciones tras las distintas diluciones inhaladas, durante 2 minutos, hasta alcanzar una caída de hasta un 20% del VEF<sub>1</sub> con relación al valor del VEF<sub>1</sub> post-diluyente (**Tabla 14**).

FeNO: 29,7 ppb.

CVF basal: 3,52 L (104%) teórico: 3,37 L

VEF<sub>1</sub> basal: 2,63 L (90%) teórico: 2,92 L

VEF<sub>1</sub>/CVF: 74%

peso: 65 kg.

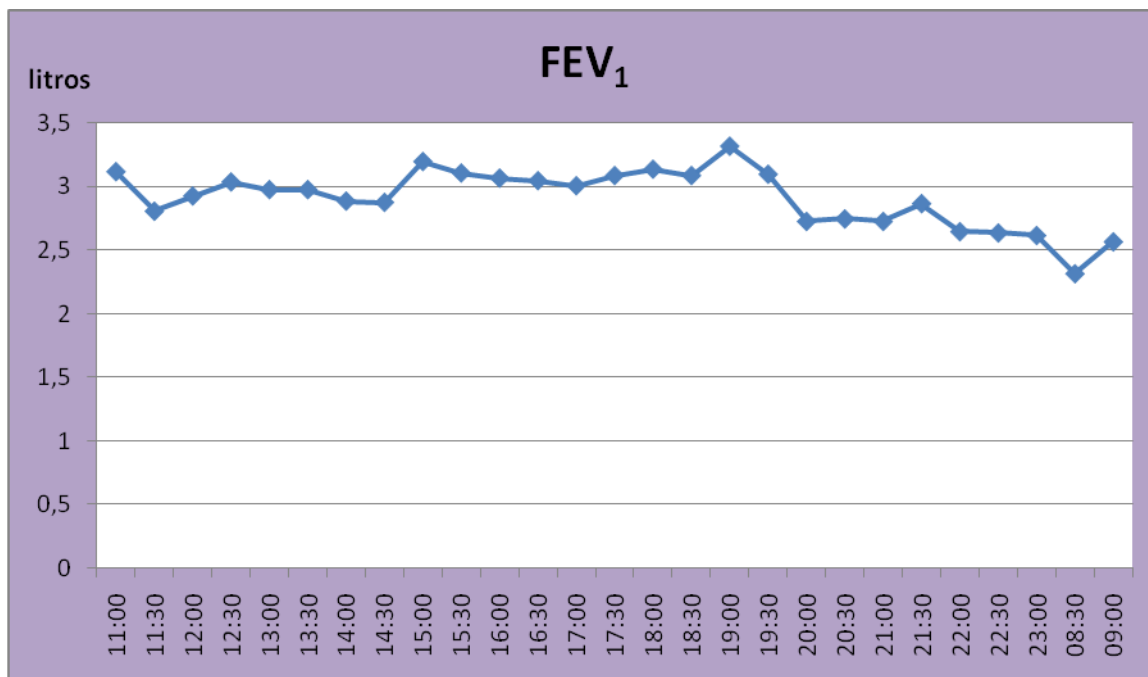
talla: 1,60 m.

Dosis	VEF <sub>1</sub> (L)	%VEF <sub>1</sub>
Basal	2,63	
post-diluyente	2,51	
0,125 mg/ml	2,32 /2,23	11%
0,25 mg/ml	2,18/1,90	24%
0,5 mg/ml		
1 mg/ml		
2 mg/ml		
4 mg/ml		
8 mg/ml		
16 mg/ml		

**Tabla 14. Valores Test de metacolina basal en paciente alérgica a hámster Siberiano.**

Tras la segunda dilución de metacolina, la paciente experimentó una caída de un 24% de su VEF<sub>1</sub>, por lo tanto la prueba se consideró positiva y se calculó la PC20: 0,21 mg/ml (hiperreactividad moderada).

Se le entregó un dispositivo portátil AMOS Jaeger®, con el cual una vez realizado el Test de metacolina, realizó mediciones cada 30 minutos del volumen espiratorio en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>). Las mediciones se realizaron hasta las 023:00 de ese mismo día y de nuevo se hicieron 2 mediciones a la mañana del día siguiente (**Fig. 18**).



**Fig. 19. Seguimiento VEF<sub>1</sub> post- provocación basal inespecífica con metacolina.**

### ***Día 2º***

Al analizar los datos anotados por la paciente y recogidos por el dispositivo portátil AMOS Jaeger®, se pudo observar que a lo largo de las mediciones recogidas hubo una uniformidad en las medidas obteniéndose el valor más alto del VEF<sub>1</sub> a las 19:00h 3,32 L correspondiendo a un 106% del valor teórico del VEF<sub>1</sub> basal, medido previo a la exposición; el valor más bajo del VEF<sub>1</sub> se recogió al día siguiente en la medición de las 8:30h con un valor de 2,32 lts correspondiendo a 74%del valor teórico del VEF<sub>1</sub> basal, medido previo a la exposición (**Fig. 18**).

### 1) Prueba de exposición controlada.

Se colocaron 4 hámsteres Siberianos dentro de una jaula y se introdujeron en la cámara de exposición inhalativa de 7 m<sup>3</sup> a las 9 horas. Se realizaron mediciones de las partículas aerosolizadas en el ambiente mediante un medidor de partículas DustTrak<sup>TM</sup> Aerosol Monitor 8520®, obteniéndose las siguientes mediciones (**Tabla 15**) (**Fig. 19-20**) antes y durante el Test de exposición realizado.

hora	número de partículas (partículas/m <sup>3</sup> )
9:00 h	0,03
9:30 h	0,065
10:00 h	0,092
10:30 h	0,123
11:00 h	0,129
11:30 h	0,130
12:00 h	0,135
12:30 h	0,137
13:00 h	0,140

Tabla 15. Medición de partículas mediante DustTrak<sup>TM</sup> Aerosol Monitor 8520®.

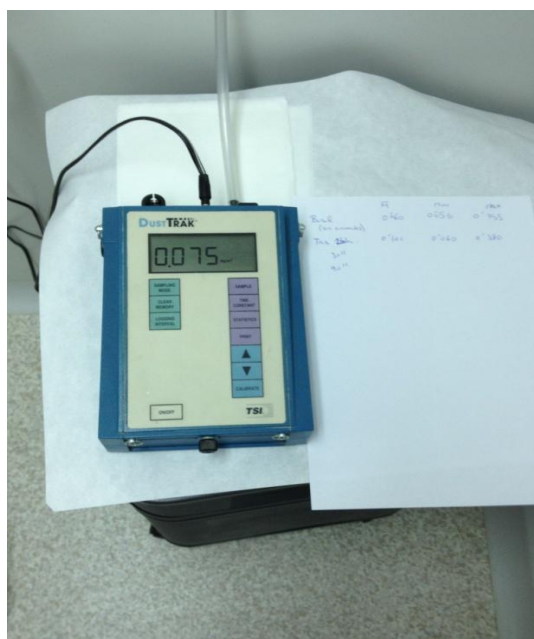


Fig. 19. Medidor de partículas DustTrak<sup>TM</sup> Aerosol Monitor 8520®

Se colocó en el interior de la cámara inhalativa, un captador de partículas con filtro automático de partículas de tipo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota). El papel de filtro (membrana de politetrafluoretileno) fue almacenado a -20°C para su posterior uso en pruebas “*in vitro*” (**Fig. 20**).

A las 11:00 horas se citó a la paciente a la cual se le realizó una determinación de FeNO: 32 ppb y una espirometría basal: CVF: 3,40 L (101%), FEV1: 2,88 L (92%).

Se le colocó una bata estéril a la paciente y se la indicó que entrara dentro de la cámara de provocación sentándose en una silla colocada dentro frente a la jaula conteniendo los hámsteres. Se realizaron varios tiempos de exposiciones con los resultados siguientes: (**Tabla 16** y **Fig. 21**).



**Fig. 20. hámsteres siberianos dentro de la cámara de provocaciones inhalativas de 7 m<sup>3</sup>.**



**Fig. 21. Paciente alérgica a hámster Siberiano durante la realización del Test de exposición a hámster Siberiano dentro de la cámara de provocaciones inhalativas de 7 m<sup>3</sup>.**

hora	tiempo de exposición	concentración de partículas (p/m <sup>3</sup> )	VEF <sub>1</sub> (L)	% caída de VEF <sub>1</sub>	síntomas
11:00	30 seg	0,129	30 seg(2,82) 2 min(2,45)	15%	rinorrea, estornudos, prurito ocular, lagrimeo.
11:15	1 min	0,130	30 seg (2,31) 2 min(2,23)	23%	Rinorrea, lagrimeo, prurito nasocular, congestión nasal, tos, opresión tórax

**Tabla 16. Medición de VEF<sub>1</sub> y síntomas tras exposición a hámster Siberiano.**

Una vez alcanzada una caída de un 23% del FEV<sub>1</sub> con relación al valor de la medición basal realizada esa mañana (VEF<sub>1</sub>: 2,88 L) además de la sintomatología presentada por la paciente, se consideró la prueba positiva.

Se le administró un comprimido de un antihistamínico (cetirizina 10mg) y se aplicaron 2 inhalaciones de un broncodilatador de rescate (salbutamol MDI 200 µg).

Se realizó una RA post-exposición con los siguientes resultados: (**Tabla 17-18**) (**Fig. 22-23**). Según la escala de valoración analógica de los síntomas naso-conjuntivales (prurito nasal, ocular, estornudos, congestión nasal, rinorrea, lagrimeo, eritema conjuntival), se llegó a alcanzar un valor de **3 puntos (severa)** tras la exposición a hámster Siberiano en ambos pacientes provocados.

(score) 0: ningún síntoma

1: un síntoma = leve

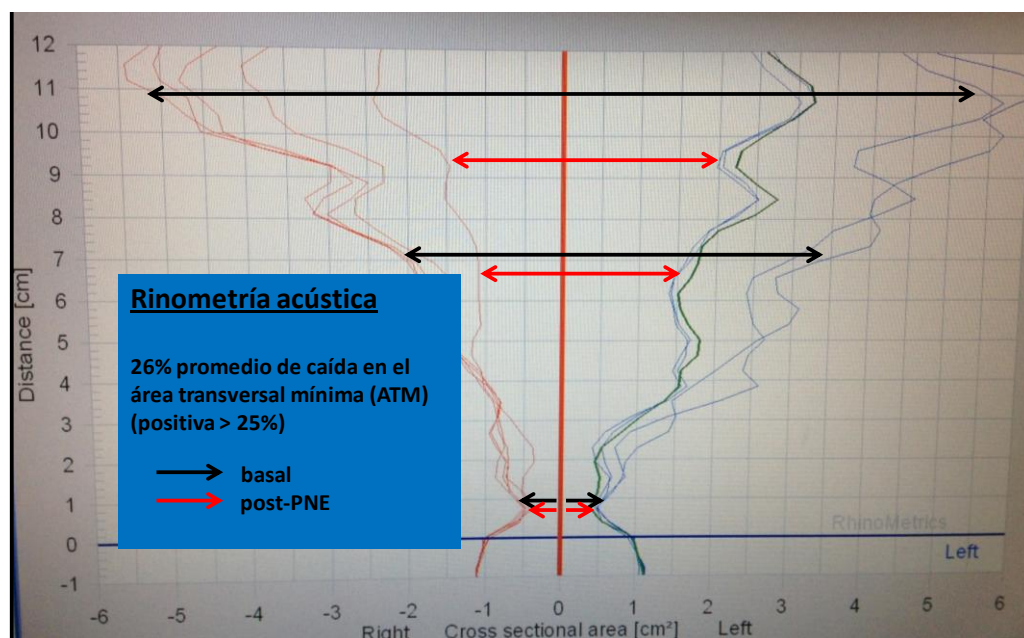
2: dos síntomas = moderado

3: tres síntomas = severo.

Paciente	dilución 1/100	dilución 1/10	dilución 1/1
síntomas	prurito nasal	prurito nasal y ocular, congestión nasal	prurito nasal y ocular, congestión nasal, estornudos.

**Tabla 17. Puntuación de síntomas naso-oculares tras PNE con distintas diluciones de extracto de pelo de hámster Siberiano.**

En el caso de esta paciente la disminución del área transversal mínima fue de 26% con respecto al valor basal, por lo que la PNE fue considerada positiva (**Fig. 23-24**).

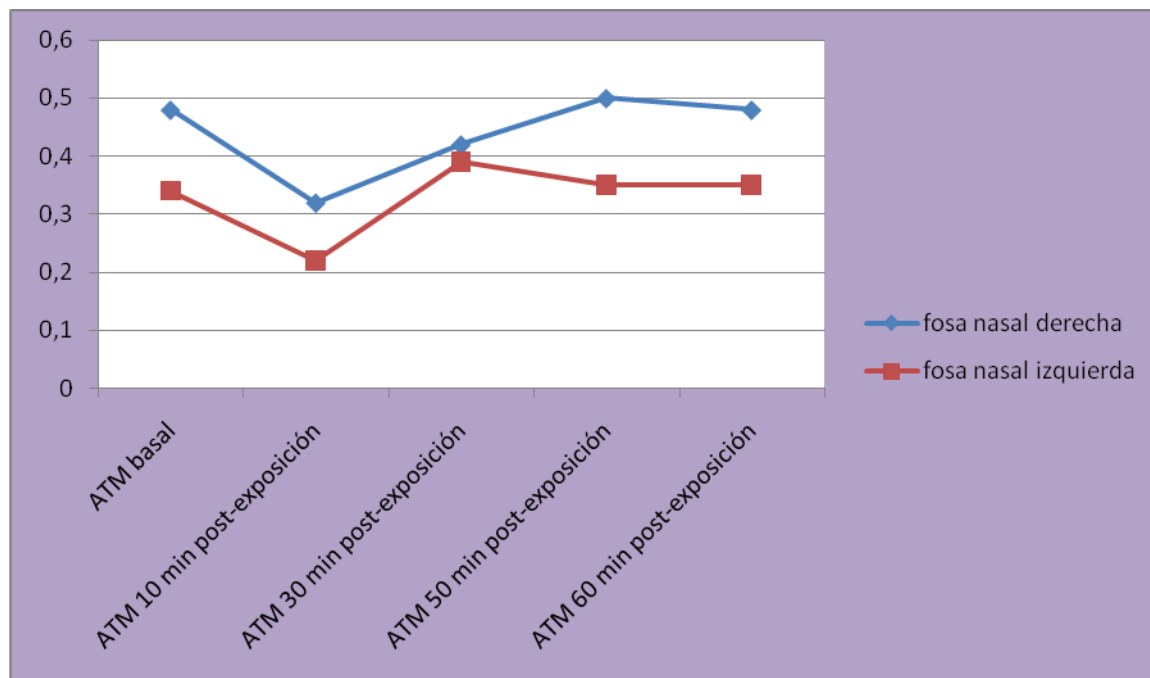


**Fig. 22. Rinometría Acústica post-exposición en paciente alérgica a hámster Siberiano.**

	Fosa nasal derecha		Fosa nasal izquierda	
tiempo	ATM	Vol	ATM	Vol
10 min	0,26	1,11	0,32	1,38
30 min*	0,39	1,28	0,42	1,45
50 min	0,35	1,56	0,50	1,63
60 min	0,35	1,66	0,48	1,63

**Tabla 18. Rinometría Acústica post-exposición a hámster Siberiano.**

\*post-vasoconstrictor nasal tópico.



**Fig. 23. Valores de área transversal mínima (ATM) en ambas fosas nasales medida basal y post-exposición a hámster Siberiano mediante Rinometría acústica.**

ATM basal fosa nasal derecha: 0,48 cm<sup>2</sup>

ATM 10 min post-exposición fosa nasal derecha: 0,32 cm<sup>2</sup>

Disminución ATM: 33,34% (positiva).

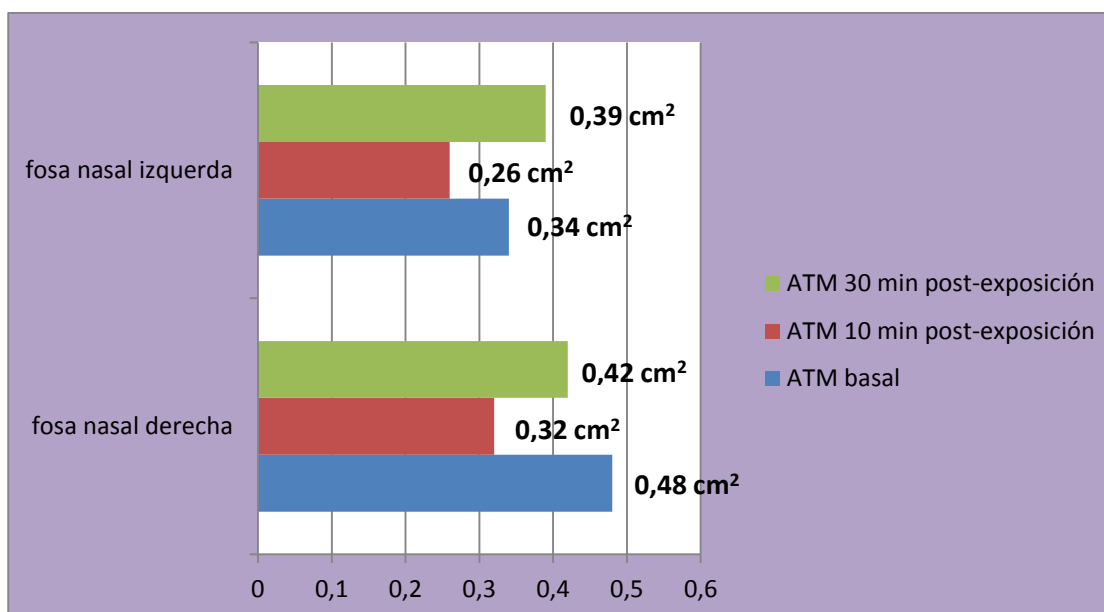
ATM basal fosa nasal izquierda: 0,34 cm<sup>2</sup>

ATM 10 min post-exposición fosa nasal izquierda: 0,22 cm<sup>2</sup>

Disminución ATM: 36% (positiva).

Se realizó una comparación entre los valores obtenidos en la RA a nivel basal y post-exposición observándose las siguientes diferencias (**Fig. 24**).





**Fig. 24. Comparativa entre valores de ATM basal, post-exposición y tras medicación tópica nasal en RA realizada a paciente alérgica a hámster Siberiano.**

\*medición 30 minutos post-exposición. (Post-instilación vasoconstrictor tópico nasal).

Se realizaron espirometrías posteriores al test de exposición y al uso del broncodilatador de rescate con los siguientes resultados: (Tabla 19).

Tiempo	VEF <sub>1</sub> (L)
10 min	2,51 (85%)
20 min	2,69 (92%)
30 min	2,73 (93%)
40 min	2,70 (92%)
50 min	2,72 93%)
60 min	2,75 (94%)

\*VEF<sub>1</sub> teórico: 2,92 lts.

**Tabla 19. Monitorización inmediata de VEF<sub>1</sub> post-exposición a hámster Siberiano.**

Una vez que la paciente estuvo en situación espirométrica basal (VEF<sub>1</sub> >80%), se le entregó de nuevo la hoja y el dispositivo portátil de medición de VEF<sub>1</sub>, para que realizara mediciones horarias y anotara los resultados hasta el día siguiente que volviera. Se realizaban tres mediciones cada vez y se anotaba la del valor más alto (Fig. 25).

Las muestras recogidas por las membranas de politetrafluoretileno colocadas en el filtro automático de partículas de tipo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota) fueron procesadas mediante la elución de las mismas, para posteriormente realizar una inmunodetección del extracto con el suero recogido de la paciente.

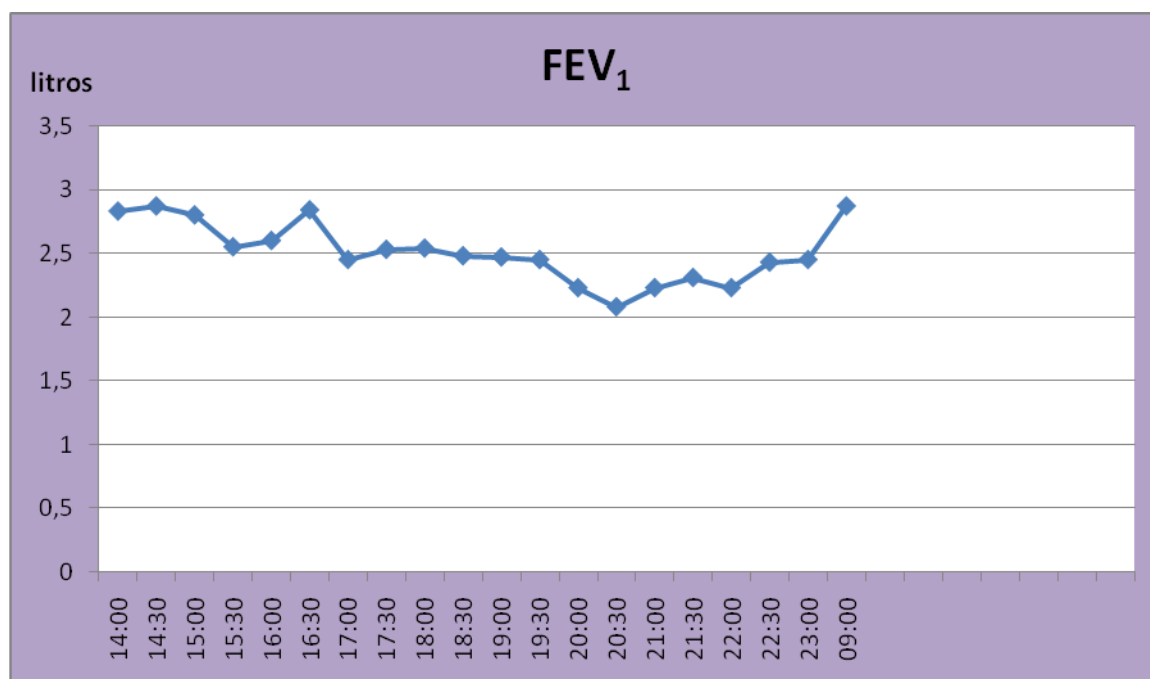


Fig.

**25. Seguimiento VEF<sub>1</sub> post- provocación basal específica con extracto de pelo de hámster Siberiano.**

**Día 3º**

Se realizaron las siguientes pruebas:

**1) Determinación de FeNO:** 49 ppb.

**2) Espirometría basal:** CVF: 2,94 (87%) VEF<sub>1</sub>: 2,87 (91%) VEF<sub>1</sub>/CVF: 97%.

Se recogieron los resultados anotados por la paciente de las mediciones del VEF<sub>1</sub>, a la vez que se confirmaron con los recogidos por el software del dispositivo portátil AMOS Jaeger® con los siguientes resultados.

Al analizar los datos anotados por la paciente y recogidos por el dispositivo portátil AMOS Jaeger®, se pudo observar que a lo largo de las mediciones recogidas hubo variaciones en el VEF<sub>1</sub> de forma intermitente. El valor de VEF<sub>1</sub> más bajo recogido fue a las 20:30h del Día 2 (mismo día post-exposición) con 2,08 L correspondiendo al 71% del VEF<sub>1</sub> teórico basal, (medido el Día 1) (**Fig. 18**). La paciente refirió que a las 20:30h se aplicó 2 inhalaciones de Salbutamol MDI 200 µg y posteriormente antes de acostarse.

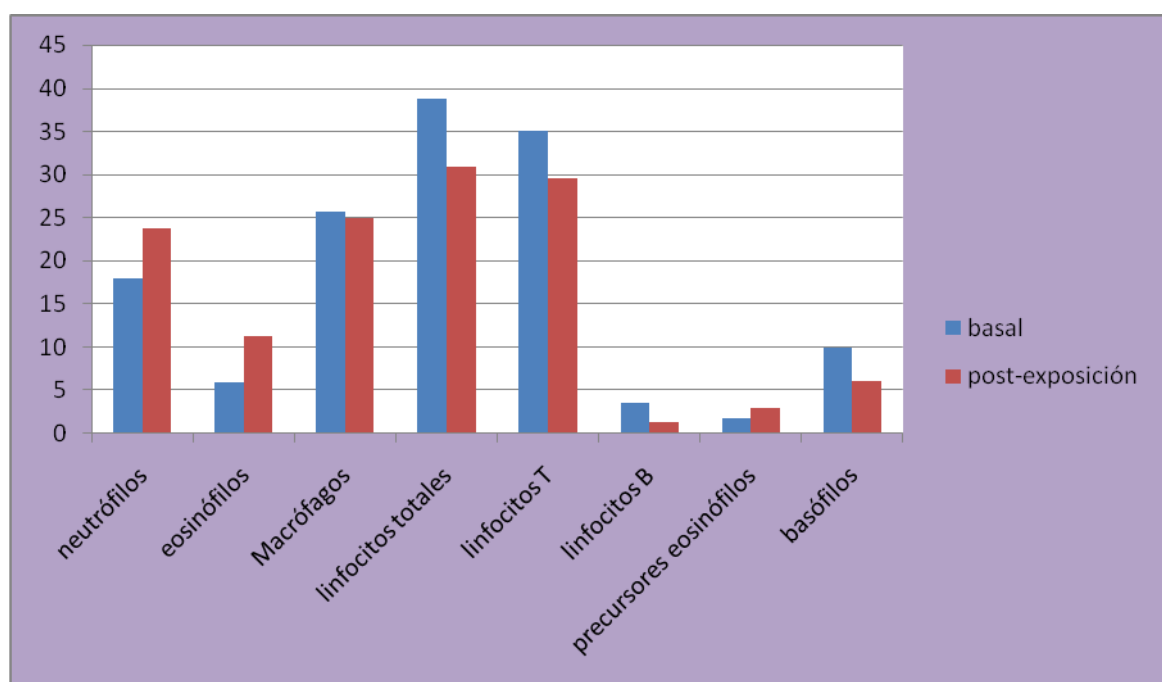
El valor de VEF<sub>1</sub> más alto recogido fue de 2,87 L correspondiendo al 98% del VEF<sub>1</sub> teórico basal medido a las 9h del Día 3 (1 día post-exposición) (**Fig. 25**).

**3) Celularidad de esputo post-exposición a extracto de pelo de hámster Siberiano:** se determinó mediante el empleo de citometría flujo con los siguientes resultados (**Tabla 20**) y a continuación se realizó una comparación entre los valores obtenidos a nivel basal y post-exposición (**Fig. 26**).



Población	% visibilidad	eventos/ $\mu$ l
neutrófilos	23,83	39,91
eosinófilos	11,33	18,97
mecrófagos	25,00	41,88
linfocitos totales	30,86	51,69
linfocitos T	29,49	49,40
linfocitos B	1,37	2,29
precursores eosinófilos	2,93	4,91
basófilos	6,05	10,14

**Tabla 20. Celularidad de esputo post-exposición en paciente alérgica a hámster Siberiano.**



**Fig. 26. Comparación celularidad en esputo basal y post-exposición a hámster Siberiano.**

#### 4) Provocación bronquial inespecífica (Test de metacolina) 24 horas post-Test de exposición.

Se realizó mediante una determinación de FeNo y a continuación un Test de metacolina con el método “volumen corriente” tal como se ha descrito anteriormente (**Tabla 21**).

FeNO: 49 ppb.

CVF: 2,94 (87%) teórico: 3,37 L

VEF<sub>1</sub>: 2,87 (91%) teórico: 2,92 L

VEF<sub>1</sub>/CVF: 97%.

peso: 65 kg.

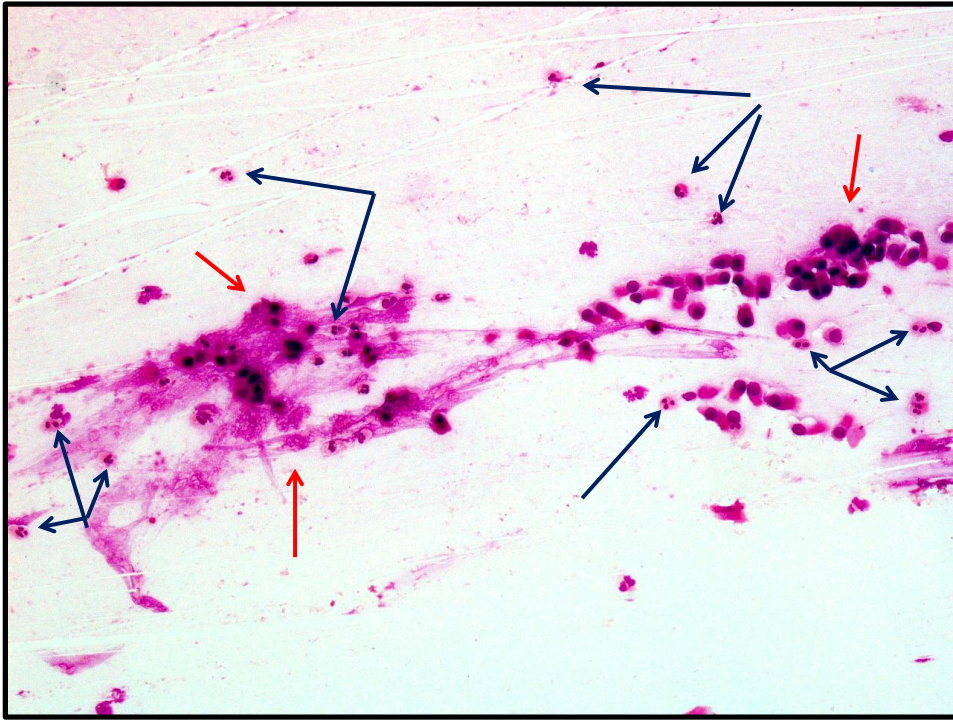
talla: 1,60 m.

dosis	VEF <sub>1</sub> (L)	%VEF <sub>1</sub>
basal	2,87	
post-diluyente	2,62	
0,125 mg/ml	2,50 /2,53	2%
0,25 mg/ml	2,39/2,41	9%
0,5 mg/ml	2,12/2,16	18% tos, opresión tórax
1 mg/ml		
2 mg/ml		
4 mg/ml		
8 mg/ml		
16 mg/ml		

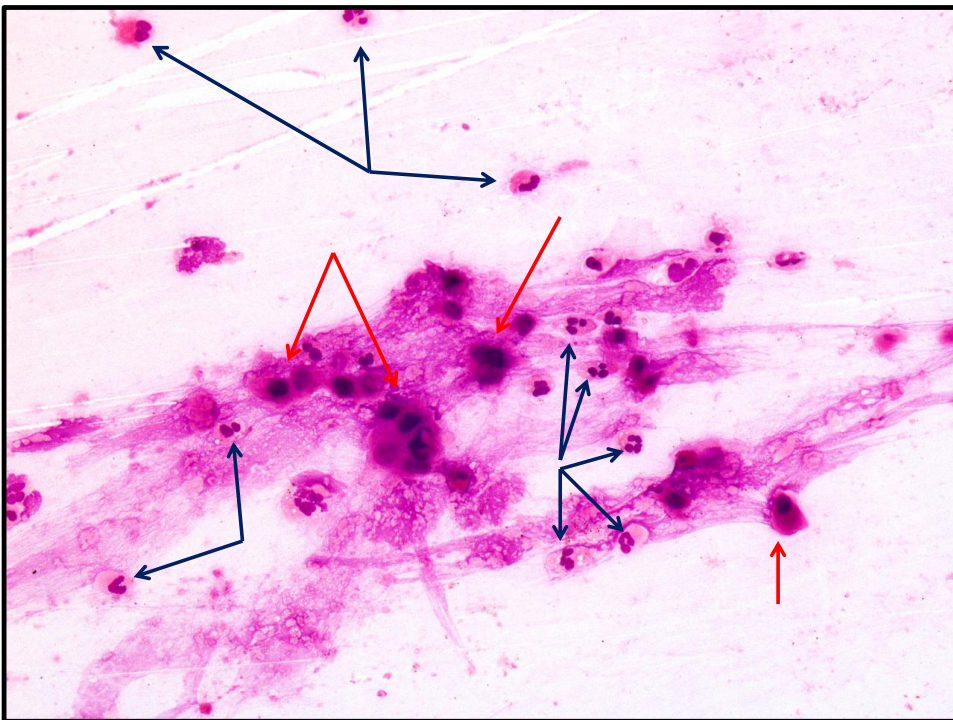
**Tabla 21. Valores Test de metacolina basal en paciente alérgica a hámster Siberiano.**

Tras la tercera dilución de metacolina, la paciente experimentó una caída de un 18% de su VEF<sub>1</sub> pero además presentó tos seca y opresión torácica, por lo tanto la prueba se suspendió y fue considerada positiva por la clínica, aún no habiendo alcanzado el 20% de caída del VEF<sub>1</sub> con relación al valor del post-diluyente (2,62 L) y se calculó la PC20: 0,8 mg/ml (hiperreactividad moderada).

**5) Citología nasal post-exposición a hámster Siberiano:** tras tinción con Giemsa y fijación al portaobjetos con citospray, se visualiza con microscopía óptica con un aumento 10X y 40X un infiltrado a base de neutrófilos y eosinófilos, células propias de un epitelio nasal inflamado (**Fig. 27-28**).



**Fig. 27. Citología nasal post-exposición a hámster Siberiano. 10X.**  
flechas rojas: neutrófilos, flechas azules: eosinófilos.



**Fig. 28. Citología nasal post-exposición a hámster Siberiano. 40X.**  
flechas rojas: neutrófilos, flechas azules: eosinófilos.

### 4.3. Revisión a los 6 meses.

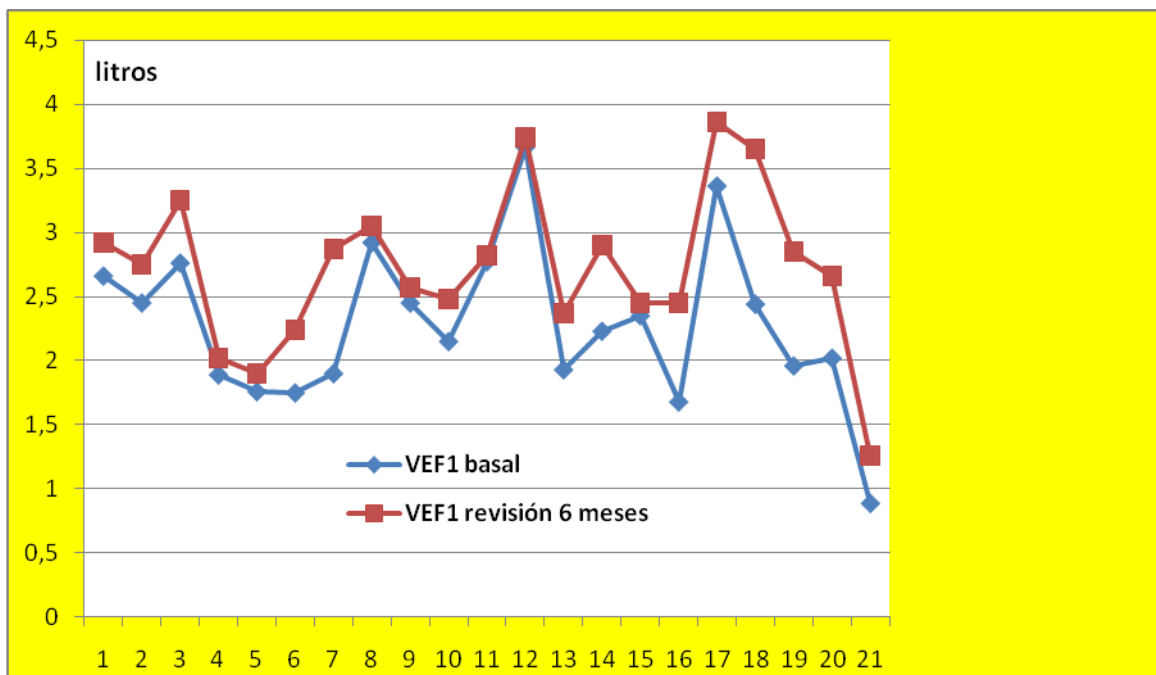
#### 4.3.1 Determinación de la Fracción de Óxido Nítrico exhalado (FeNO) y espirometría basal.

Se realizó una determinación del FeNO y una espirometría a cada paciente incluido. Los resultados fueron los siguientes: (Tabla 22).

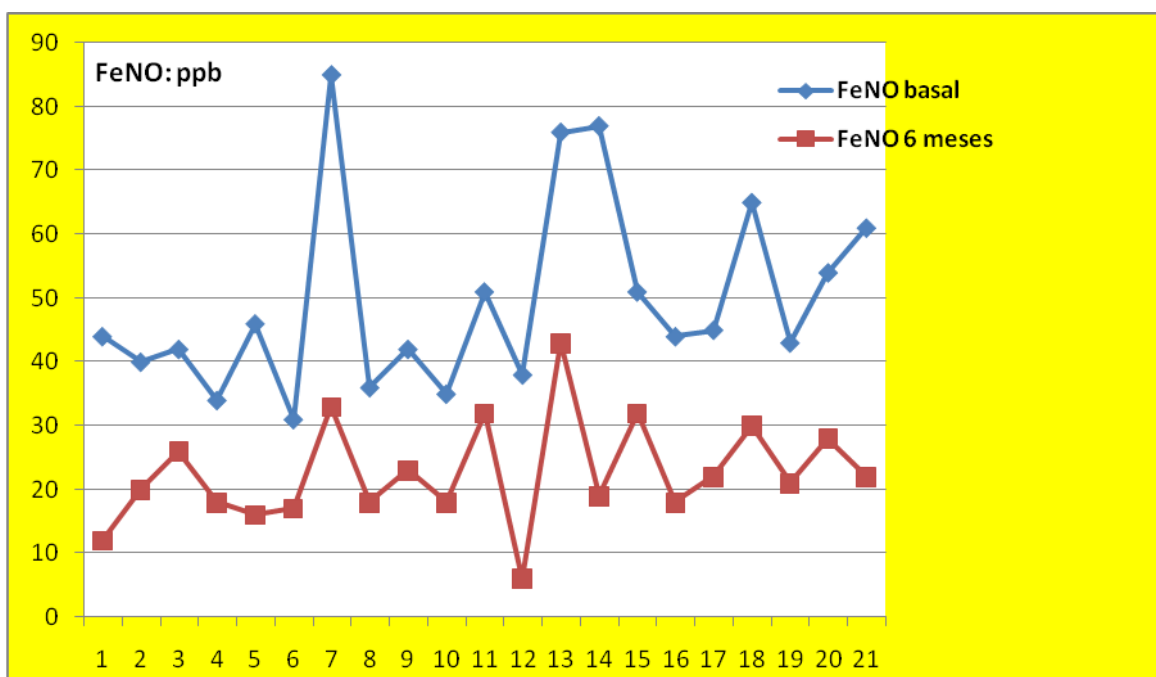
P	E	S	FeNO	CVF	VEF <sub>1</sub>	VEF <sub>1</sub> /CVF
1	46	M	12	3,74 (100%)	2,92(90%)	78%
2	43	M	20	3,34 (88%)	2,75 (83%)	82%
3	27	M	26	4,28 (97%)	3,25 (90%)	76%
4	14	H	18	2,15: 96%	2,02 91%	90%
5	42	M	16	2,32 (89%)	1,90 (92%)	81%
6	10	M	17	2,96 (106%)	2,24 (94%)	76%
7	43	M	33	3,02 (93%)	2,87 (103%)	82%
8	17	H	18	3,14 115%	3,05 117%	97%
9	12	H	23	2,91 (96%)	2,57 (78%)	88%
10	27	H	18	2,73 (79%)	2,48 (82%)	90%
11	33	M	32	2,91 114%	2,82 106%	98%
12	23	M	6	3,38 (93%)	3,74 95%	93%
13	33	M	43	2,45 (80%)	2,37 (80%)	96%
14	42	M	19	3,40 (95%)	2,90 (90%)	84%
15	12	H	32	2,76 ( 116%)	2,45 88%	99%
16	12	M	18	2,76 (99%)	2,45 (102%)	88%
17	11	M	22	5,56 (102%)	3,86 (85%)	69%
18	27	H	30	4,27 (107%)	3,65 (105%)	85%
19	41	M	21	3,59 (109%)	2,85 (100%)	79%
20	39	M	28	3,15 (93%)	2,66 (90%)	84%
21	18	H	22	1,38 (94%)	1,26	91%

**Tabla 22. Pruebas funcionales respiratorias en pacientes alérgicos a hámster Siberiano en la revisión a los 6 meses.** P: paciente. E: edad. S: sexo (H: hombre, M: mujer). FeNO: fracción exhalada de Óxido Nítrico. CVF: capacidad vital forzada. VEF<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo. VEF<sub>1</sub>/CVF: cociente o Índice de Tiffeneau (>70% = normal).

Se realizó una comparación de las espirometrías realizadas en el momento de la inclusión y posteriormente en el momento de la revisión a los 6 meses, considerando el valor del VEF<sub>1</sub> como parámetro más importante a evaluar entre ambos momentos (Fig. 29). De igual modo, se realizó una comparación entre las mediciones del FeNO en el momento de la inclusión y en el momento de la revisión a los 6 meses (Fig. 30).



**Fig. 29. Comparativa del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>) en pacientes alérgicos a hámster Siberiano en el momento de la inclusión en el estudio y 6 meses después.**



**Fig. 30. Comparativa de la fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) en pacientes alérgicos a hámster Siberiano en el momento de la inclusión en el estudio y 6 meses después.**  
**ppb:** partes por billón.

### 4.3.2. Análisis estadístico de las pruebas funcionales respiratorias.

Se realizó una comparación entre los valores espirométricos y la determinación de FeNO realizadas a nivel basal y posteriormente en la revisión a los 6 meses. Se muestra una descripción de los datos de cada tabla mediante la Media y la Desviación Estándar (DS), y luego la diferencia (post-pre), es decir, los valores de la revisión a los 6 meses se le restan los valores hallados a nivel basal.

Estas diferencias se resumen mediante la Media, el Intervalo de confianza al 95% y el valor de p. Estos valores de p se han obtenido comparando los valores pre y post mediante la prueba de la t de Student para muestras dependientes. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  que existe diferencia entre los valores previos y los posteriores (**Tabla 23**).

Parámetro	Pre		Post		Diferencia (post – pre)			
	Media	DS	Media	DS	Media	Int confianza 95%	Valor p	
FeNO	49,52	15,10	22,57	8,27	-26,95	-2,30	-21,60	<0,0001
CVF	2,80	0,80	3,15	0,87	0,35	0,19	0,52	0,0002
CVF (%)	87,81	12,13	98,14	10,32	10,33	5,82	14,84	0,0001
VEF <sub>1</sub>	2,28	0,62	2,72	0,62	0,43	0,28	0,58	<0,0001
VEF <sub>1</sub> (%)	82,71	26,09	93,05	9,92	9,10	-3,38	21,58	<0,0001
VEF <sub>1</sub> /CVF	80,67	9,75	86,00	8,11	5,33	2,55	8,12	<0,0001

**Tabla 23. Comparativa entre valores espirométricos y determinaciones de FeNO realizadas a nivel basal (pre) y a los 6 meses (post).**

Se realizó una tabla comparando las frecuencias de pacientes que presentaron valores normales de VEF<sub>1</sub>, VEF<sub>1</sub>/CVF y FeNO antes y después del tratamiento. Se muestran el número y el porcentaje de pacientes que presentaron valores normales y las diferencias entre los porcentajes, junto con su Intervalo de confianza al 95%. El valor de p se obtuvo comparando los datos pre y post mediante la prueba de Mc Nemar (**Tabla 24**).

Parámetro	Pre		Post		Diferencia (post – pre)			
	N	%	N	%	Dif (Int. confianza 95%)			Valor p
VEF <sub>1</sub>	1	4,8	18	90,0	85,0	44,6	100	0,0001
VEF <sub>1</sub> /CVF	15	71,4	20	95,2	23,8	-0,9	48,5	0,1306
FeNO	0	0,0	14	66	66,7	31,7	100	0,0005

**Tabla 24. Comparativa entre frecuencias de pacientes con valores espirométricos y determinaciones de FeNO normales realizadas a nivel basal (pre) y a los 6 meses (post).**



### 4.3.3. Pruebas cutáneas con extractos de hámsteres en la revisión a los 6 meses.

A los 6 meses se realizó una revisión en la consulta de Alergología a cada paciente incluido en el estudio, tras la retirada del (los) hámster(es) del domicilio, medida que fue indicada en su primera visita cuando se les diagnosticó de “alérgicos a hámster Siberiano”.

Se realizaron pruebas cutáneas solamente con los extractos alergénicos de las especies de hámsteres incluidas, siguiendo el mismo procedimiento que durante la visita de inclusión (Tabla 25).

Se comprobó que los 21 pacientes incluidos seguían presentando pruebas cutáneas positivas para los extractos de hámster Siberiano: 3 pacientes (14,28%) resultaron estar sensibilizados sólo al pelo, mientras que el resto, 18 pacientes (85,71%) seguían manteniendo la sensibilización a los tres extractos alergénicos (pelo, glándulas salivales y orina). La media del diámetro de la pápula, en esta ocasión, para las pruebas cutáneas tanto para el extracto de pelo, glándulas salivales y de orina fue de 3 x 4 mm (Tabla 25).

De los 21 pacientes incluidos en el estudio, 7 pacientes (33,33%) seguían estando sensibilizados a su vez a los extractos de pelo, glándulas salivales y de orina del hámster Roborowski (Tabla 25).

H. Siberiano				H. común			H. dorado			H. Roborowski		
P	p	gs	O	p	gs	o	p	gs	o	p	gs	o
1	4x4	4x4	3x3	0	0	0	0	0	0	3x3	0	0
2	3x3	3x4	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3x4	3x3	3x3	0	0	0	0	0	0	3x3	3x3	3x3
5	3x4	3x3	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3x3	3x3	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	3x4	3x4	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	3x3	3x3	3x4	0	0	0	0	0	0	3x3	3x4	3x3
10	3x4	3x4	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4x4	4x4	4x3	3x4	3x4	0	0	0	0	0	0	0
12	3x4	3x4	3x3	0	0	0	0	0	0	3x3	3x3	3x3
13	4x4	3x4	3x3	0	0	0	0	0	0	3x4	3x3	3x3
14	3x4	3x3	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	3x4	3x3	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	4x4	3x4	3x4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	3x4	3x4	3x4	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0
19	3x3	3x4	3x4	3x3	0	0	0	0	0	0	0	0
20	3x4	4x4	3x4	0	0	0	0	0	0	3x4	3x3	3x3
21	4x4	3x4	3x4	0	0	0	0	0	0	3x3	3x3	3x3

Tabla 25. Pruebas cutáneas de pacientes alérgicos a hámster Siberiano con cada especie de hámster incluida, durante la visita de revisión a los 6 meses. P: paciente. p: pelo. gs: glándulas salivales. o: orina. mm: milímetro.

#### 4.3.4. Tiempo de mejoría.

Durante la anamnesis realizada también se interrogó al paciente por el “tiempo de mejoría” e igualmente se le preguntó por la medicación utilizada desde el momento del diagnóstico de su enfermedad hasta el momento de la revisión (**Tabla 26**).

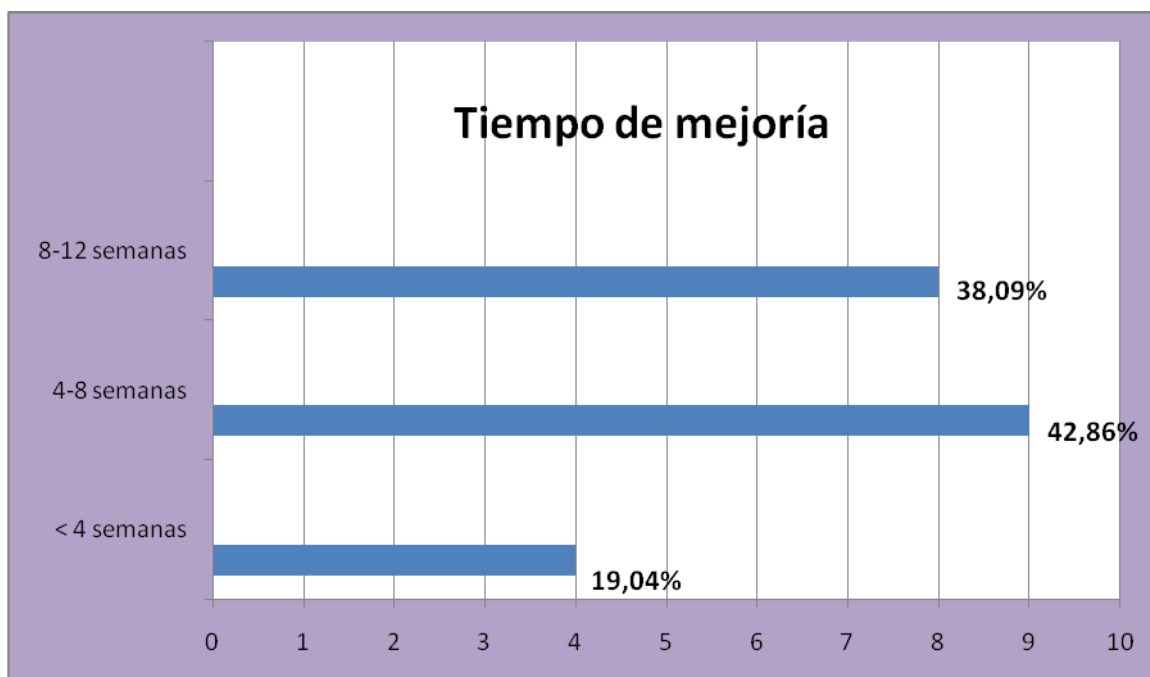
Se confirmó que tras la retirada de la exposición al/a los hámster/es dentro de su domicilio 4 pacientes (19,04%) mejoraron antes de las 4 semanas, 9 pacientes (42,86%) lo hicieron entre 4 a 8 semanas, mientras que 8 pacientes (38,09%) lo hicieron entre la octava y doceava semana tras cesar la exposición (**Tabla 26**) (**Fig. 31**).

Además del cese de la exposición recomendado en consulta, se indicó tratamiento con combinación de broncodilatadores de larga acción (LABA) más esteroides inhalados (EI) y broncodilatadores de rescate (BR) a 2 pacientes (9,52%), mientras que a 13 pacientes (61,90%) además de los LABA+EI se la añadieron antihistamínicos (antiH1). Sólo 5 pacientes (23,80%) utilizaron sólo antihistamínicos más corticoides tópicos nasales. Hubo un solo caso (4,76%) de anafilaxia por mordedura en un dedo que fue tratado en Urgencias donde recibió tratamiento con adrenalina subcutánea, corticoide y antihistamínico intravenosos, con recuperación y alta médica en las siguientes 12 horas de estancia en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz (**Tabla 26**) (**Fig. 32**).

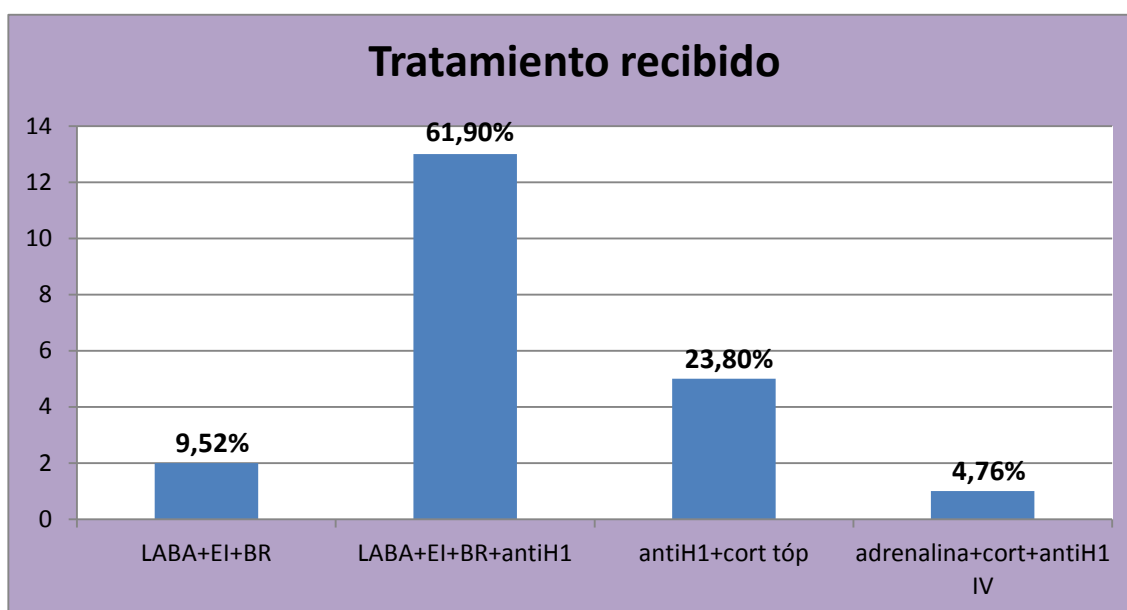
Paciente	tiempo de mejoría	tratamiento recibido	visitas a Urgencias
1	8-12	LABA+EI+BR	no
2	4-8	LABA+EI+BR	si
3	< 4	antiH1+cort top	no
4	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
5	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
6	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
7	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
8	<4	antiH1+cort top	no
9	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
10	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
11	< 4	adrenalina+cort IV+antiH1 IV	si
12	8-12	LABA+EI+BR+antiH1	si
13	8-12	LABA+EI+BR+antiH1	si
14	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	si
15	8-12	LABA+EI+BR+antiH1	si
16	8-12	antiH1+cort top	no
17	8-12	antiH1+cort top	no
18	< 4	antiH1+cort top	no
19	4-8	LABA+EI+BR+antiH1	no
20	8-12	LABA+EI+BR+antiH1	si
21	8-12	LABA+EI+BR+antiH1	si

**Tabla 26. Evolución y tratamiento pacientes alérgicos a hámster Siberiano.** LABA: broncodilatador de larga acción. EI: esteroides inhalados. BR: broncodilatador de rescate. antiH1: antihistamínicos. cort top: corticoides inhalados nasales. IV: intravenoso.





**Fig. 31. Tiempo de mejoría de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**



**Fig. 32. Tratamiento recibido por los pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

LABA: broncodilatador de larga acción. EI: esteroides inhalados. BR: broncodilatador de rescate. antiH1: antihistamínicos. cort. tóp: corticoides inhalados nasales. IV: intravenoso

#### 4.3.5. Análisis estadístico Tiempo de latencia Vs Tiempo de mejoría.

Se realizó una correlación Tiempo de latencia Vs Tiempo de mejoría mediante una tabla de contingencia mostrando el cruce de las dos variables cualitativas aplicando la prueba de asociación de Chi-cuadrado (**Tabla 27**).

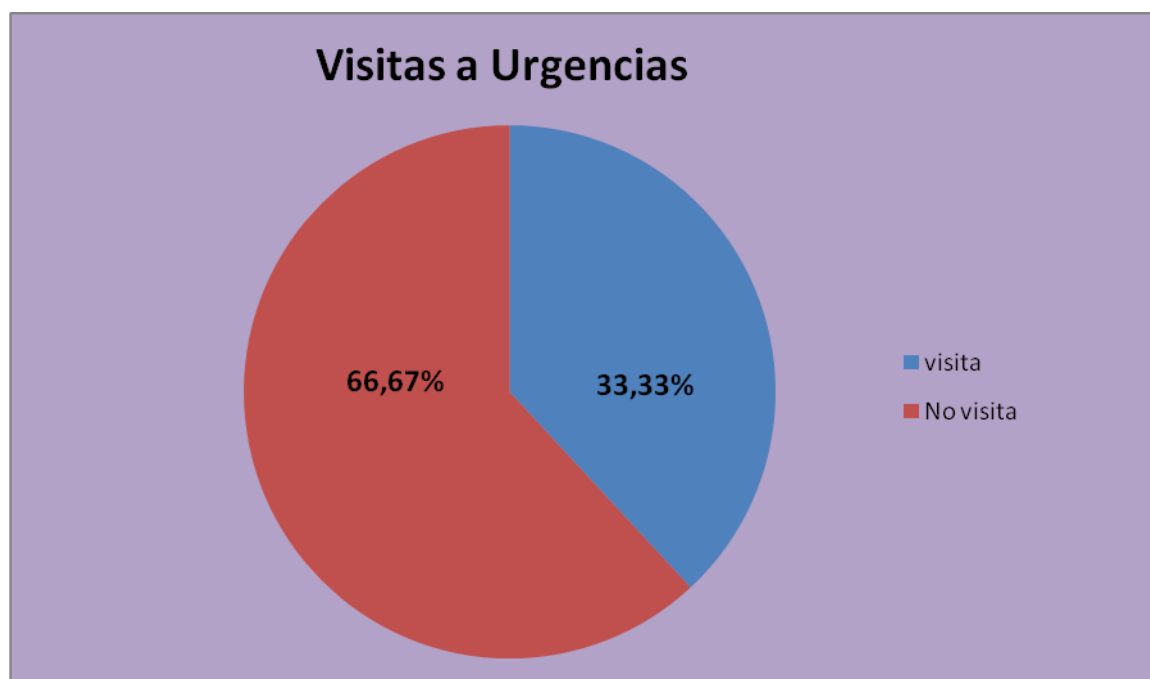
Tiempo de latencia	Tiempo de mejoría			
	< 4 semanas	4-8 semanas	8-12 semanas	Total
<4 semanas	1 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)	3 (100%)
4-8 semanas	1 (9,1%)	7 (63,6%)	3 (27,3%)	11 (100%)
8-12 semanas	0 (0,0%)	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4 (100,0%)
>12 semanas	2 (66,7%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	3 (100%)

**Tabla 27. Correlación Tiempo de latencia Vs Tiempo de mejoría de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano. Valor p: 0,01204.**

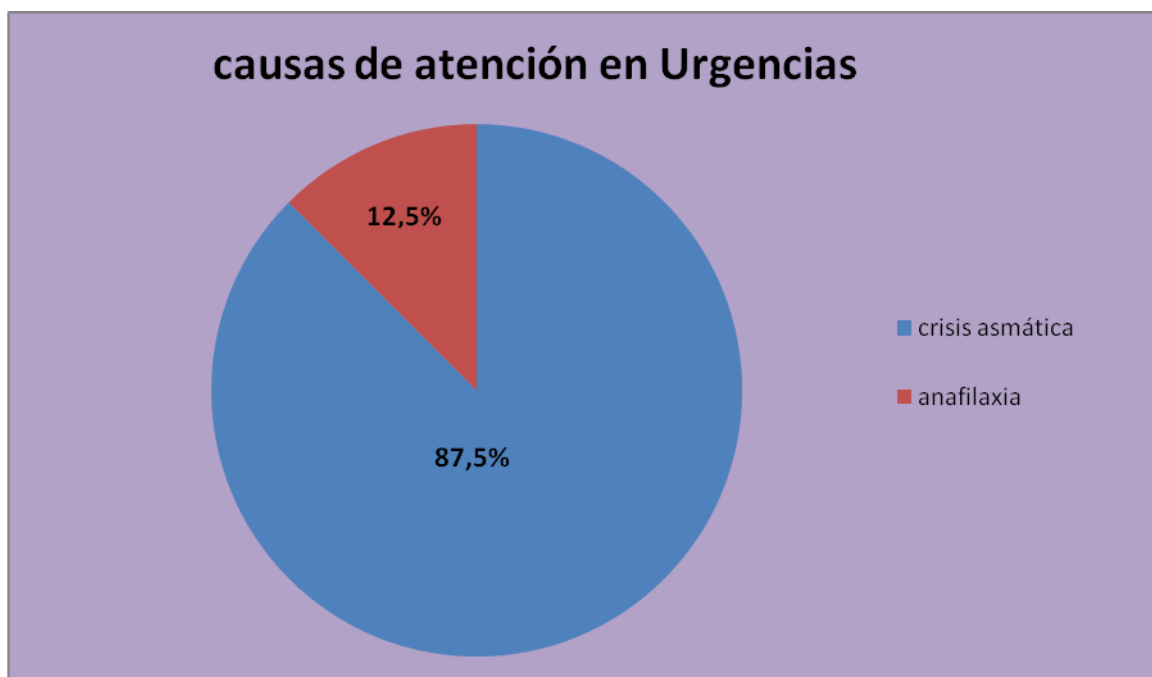
#### 4.4. Visitas a Urgencias.

De los 21 pacientes incluidos en el Estudio, hasta 8 pacientes (38,09%) fueron atendidos en Urgencias antes de ser vistos en la consulta de Alergia, mientras que los 13 pacientes (66,67%) restantes no requirieron atención (**Fig. 33**).

La causa principal de visita a Urgencias en 7 pacientes (87,5%) fue por reagudización asmática relacionada con la exposición al/a los hámster/es dentro de su domicilio, mientras que hubo 1 paciente (12,5%) que requirió tratamiento y observación en Urgencias durante 12 horas, tras haber presentado una reacción de anafilaxia (urticaria generalizada, angiodema, párpados, labios, disnea y mareo) a los 5 minutos tras mordedura en un dedo por el hámster Siberiano que tenía en su domicilio (**Fig. 34**).



**Fig. 33. Visitas a Urgencias de los pacientes incluidos en el estudio.**



**Fig. 34. Causas de atención en Urgencias pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

#### 4.5. Estudios “in vitro”.

##### 4.5.1. Cuantificación de proteínas de los extractos alergénicos de las distintas especies de hámsteres incluidas en el estudio.

Se realizó una curva patrón partiendo de una concentración de BSA 2mg/ml, realizándose diluciones consecutivas a la mitad hasta alcanzar una concentración de 0,0625 mg/ml. Se utilizó reactivo de azul de Coomasie para la lectura de la placa a una absorbancia de 620 nm de longitud de onda.

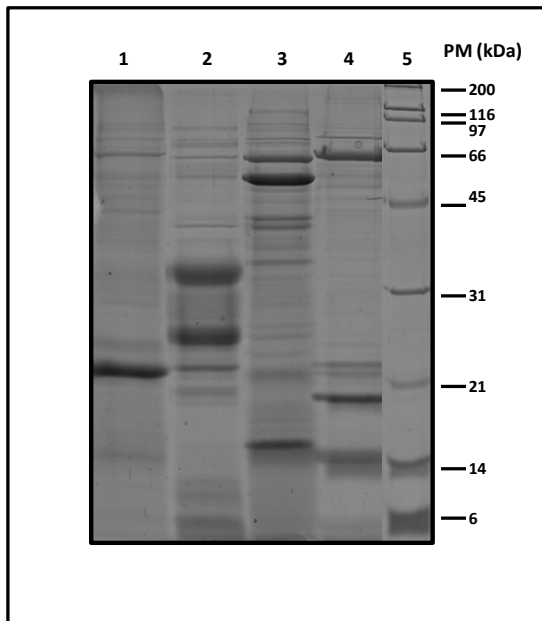
La cantidad de proteínas de los extractos alergénicos estudiados fue la siguiente: (Tabla 28).

extracto alergénico	cantidad de proteínas (µg/µl)
<i><b>hámster Siberiano</b></i>	
pelo	0,523
glándulas salivales	1,828
orina	0,570
filtro Air sentinel	0,075
<i><b>hámster común</b></i>	
pelo	0,290
glándulas salivales	1,937
orina	1,121
<i><b>hámster dorado</b></i>	
pelo	0,516
glándulas salivales	1,977
orina	1,172
<i><b>hámster Roborowski</b></i>	
pelo	0,087
glándulas salivales	1,274
orina	1,665

Tabla 28. Cuantificación extractos alergénicos hámsteres (Bradford®).

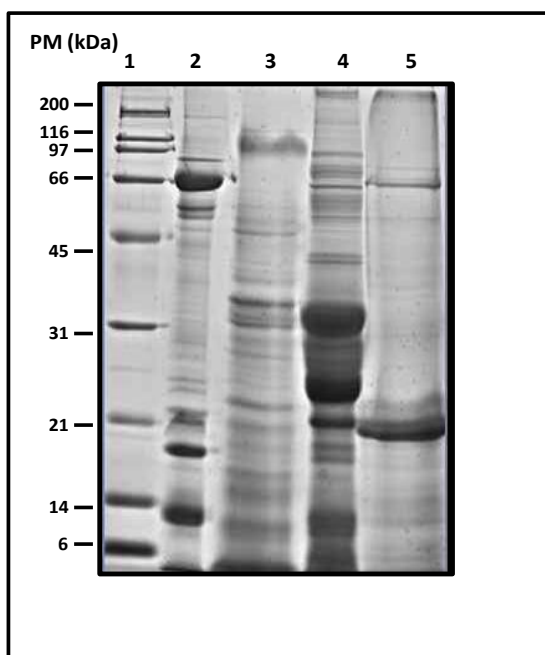
#### 4.5.2. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Con el fin de identificar las proteínas causantes de los síntomas alérgicos tras la exposición a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 14% en condiciones reductoras de cada una de las tres fuentes alérgicas (pelo, glándulas salivales y orina) de los cuatro hámsteres estudiados. Finalizada la electroforesis, se realizó una tinción de los geles mediante Azul de Coomasie revelando la presencia de múltiples bandas proteicas con una masa molecular comprendida entre los 6 y 97 kDa aproximadamente (Fig. 35-37).



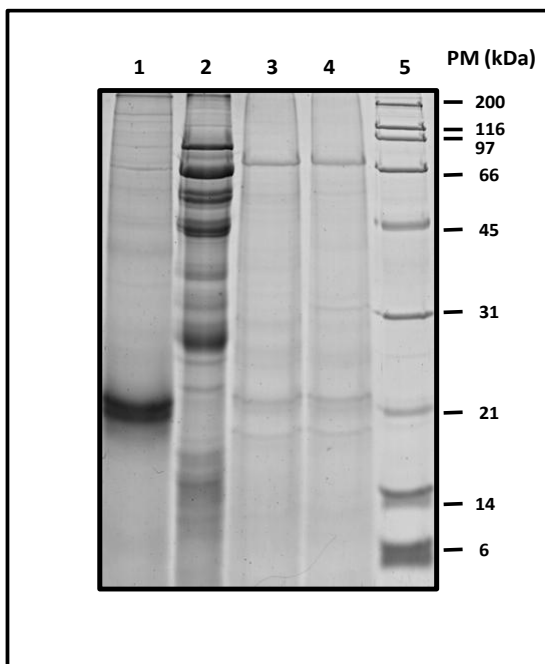
**Fig. 35. SDS-PAGE de extractos de pelo de especies de hámsteres incluidas en el estudio.**

- 1.- hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).
  - 2.- hámster común (*Cricetus cricetus*).
  - 3.- hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).
  - 4.- hámster Roborowski (*Phodopus Roborowskii*).
- PM: marcadores de peso molecular (kDa).



**Fig. 36. SDS-PAGE de extractos de glándulas salivales de especies de hámsteres incluidas en el estudio.**

- 1.- hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*)
  - 2.- hámster común (*Cricetus cricetus*)
  - 3.- hámster dorado (*Mesocricetus auratus*)
  - 4.- hámster Roborowski (*Phodopus Roborowskii*)
- PM: marcadores de peso molecular (kDa).

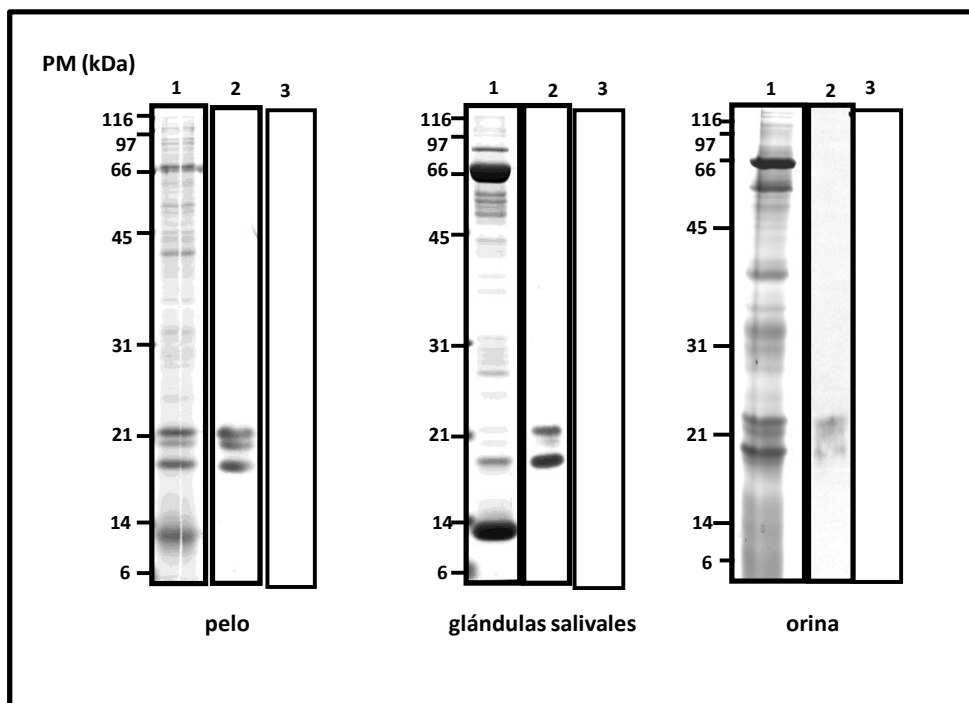


**Fig. 37. SDS-PAGE de extractos de orina de especies de hámsteres incluidas en el estudio.**

- 1.- hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).
  - 2.- hámster común (*Cricetus cricetus*).
  - 3.- hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).
  - 4.- hámster Roborowski (*Phodopus Roborowskii*).
- PM: marcadores de peso molecular (kDa).

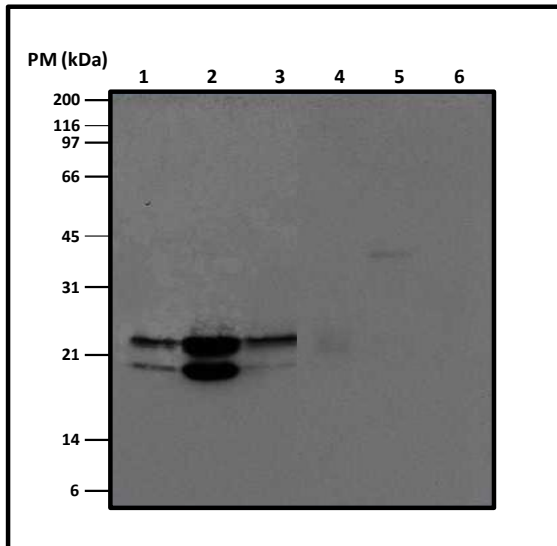
#### 4.5.3. Ensayos de Inmunodetección (Western blot).

Se realizaron pruebas de inmunodetección utilizando una mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), donde se observó que los pacientes presentaban tres bandas fijadoras de IgE con un peso aproximado de 18, 21 y 23 kDa, tanto en el extracto de pelo, glándulas salivales y de orina respectivamente. Se utilizó el suero de un paciente no atópico como control (**Fig. 38**).



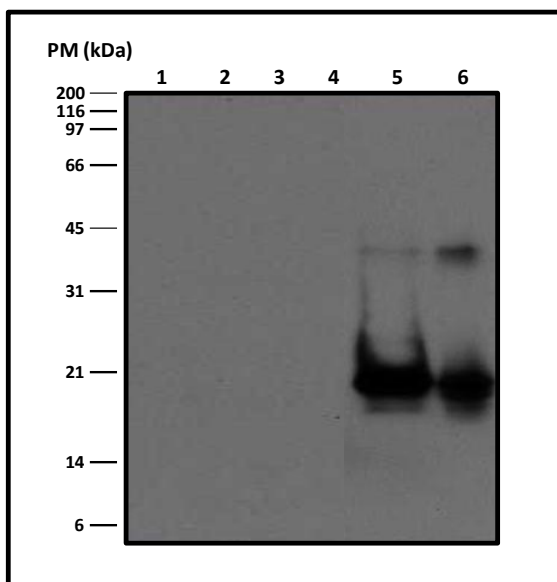
**Fig. 39. SDS-PAGE e Inmunodetección (Western blot) de extractos de fuentes alérgicas de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) frente a pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano.** 1: SDS-PAGE fuente alérgica. 2: Inmunodetección (Western blot). 3: suero no atópico. PM: marcadores de peso molecular (kDa).

Se realizaron ensayos de inmunodetección (Western blot) con mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano frente a las tres fuentes alergénicas de cada una de las especies de hámsteres estudiadas: hámster Siberiano, hámster común, hámster dorado y hámster Roborowski. Se observó que el pool de suero reconocía un perfil de bandas fijadoras de IgE entre 18-23 kDa solamente en las tres fuentes alergénicas de hámster Siberiano como en las de hámster Roborowski respectivamente (**Fig. 39-40**).



**Fig. 39. Inmunodetección (Western blot) de pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano frente a extractos de fuentes alergénicas de hámster Siberiano y de hámster común.**

1: pelo de hámster Siberiano.  
2: glándulas salivales de hámster Siberiano.  
3: orina de hámster Siberiano.  
4: pelo de hámster común.  
5: glándulas salivales de hámster común.  
6: orina de hámster común.  
PM: marcadores de peso molecular (kDa).



**Fig. 40. Inmunodetección (Western blot) de pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano frente a extractos de fuentes alergénicas de hámster dorado y de hámster Roborowski.**

1: pelo de hámster dorado.  
2: glándulas salivales de hámster dorado.  
3: orina de hámster dorado.  
4: pelo de hámster Roborowski.  
5: glándulas salivales de hámster Roborowski.  
6: orina de hámster Roborowski.  
PM: marcadores de peso molecular (kDa).

#### 4.5.4 Ensayos de Reactividad cruzada.

##### 4.5.4.1 Ensayos de Inhibición de las fuentes alergénicas del hámster Siberiano mediante Western blot-inhibición.

Se llevaron a cabo ensayos de inhibición con las tres fuentes alergénicas estudiadas del hámster Siberiano: pelo, glándulas salivales y orina, que se utilizaron en fase sólida en cada ensayo. Se utilizó una mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano, que fueron pre-incubados utilizando los distintos extractos de fuentes alergénicas: pelo, glándulas salivales y orina como inhibidor esa una concentración de 100µg/ml.

Se pudo observar que las proteínas fijadoras de IgE de cada extracto de las tres fuentes alergénicas se inhibían en su totalidad en cada uno de los tres ensayos. Se utilizó BSA como control negativo de inhibición y el suero de un paciente no atópico como control negativo (Fig. 41).

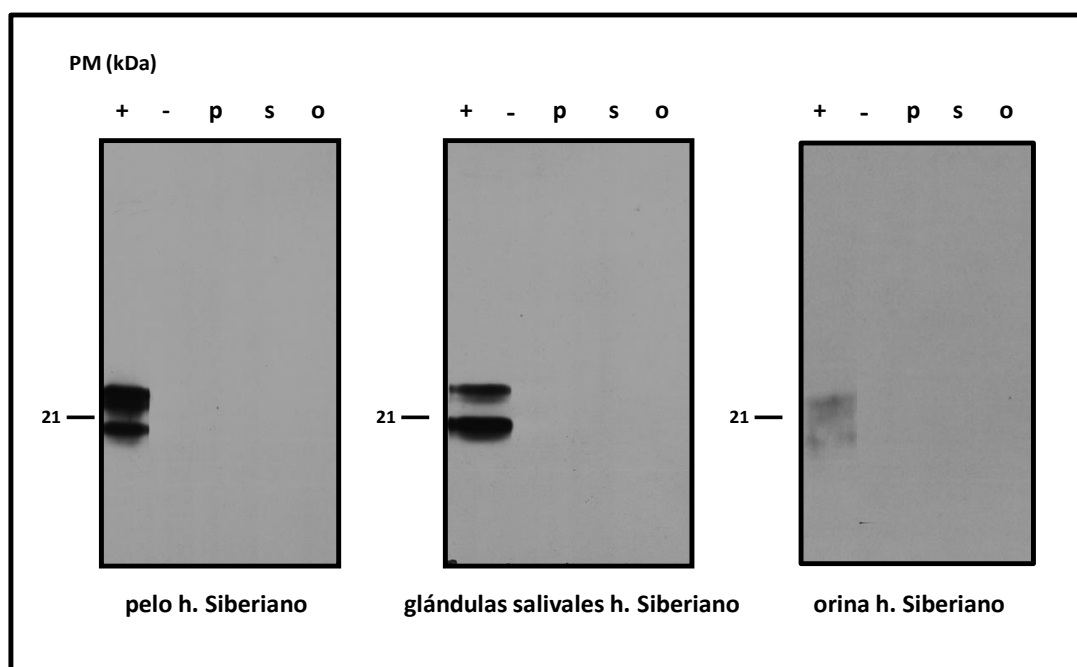


Fig. 41. Inmunodetección-inhibiciones (Western blot-inhibiciones) con pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano pre-incubados con extractos de las tres fuentes alergénicas (pelo, glándulas salivales y orina) frente a extractos de pelo, glándulas salivales y de orina de hámster Siberiano en fase sólida respectivamente. p: pelo. s: glándulas salivales. o: orina. +: BSA: control negativo de inhibición -: control negativo (suero no atópico). PM: marcadores de peso molecular (kDa).

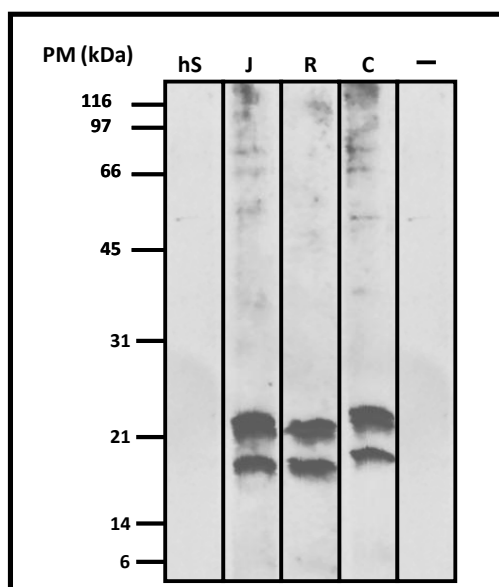


#### 4.5.4.2 Ensayos de inhibición con otras especies de roedores.

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición utilizando extracto de pelo de hámster Siberiano en fase sólida. Se utilizó una mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano, pre-incubados con extractos de pelo de jerbo (*Meriones unguiculatus*), ratón (*Mus musculus*) y conejo (*Oryctolagus cuniculus*) a una concentración de inhibición de 100µg/ml.

Se observó que las bandas fijadoras de IgE presentes en el extracto de pelo de hámster Siberiano en fase sólida no fueron inhibidas por ninguno de los extractos de pelo de jerbo, ratón y conejo que se utilizaron como inhibidores en la mezcla (pool) de sueros pre-incubados con los mismos.

Se confirmó que sólo se inhibían dichas bandas en su totalidad cuando se utilizó el extracto de pelo de hámster Siberiano como inhibidor. Se utilizó el suero de un paciente no atópico como control (**Fig. 42**).



**Fig. 42. Inmunodetección-inhibición (Western blot inhibición) con pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano pre-incubados con extractos de pelo de otros roedores y conejo.**

\* fase sólida: extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano.

hS: hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*)

J: jerbo (*Meriones unguiculatus*)

R: ratón (*Mus musculus*)

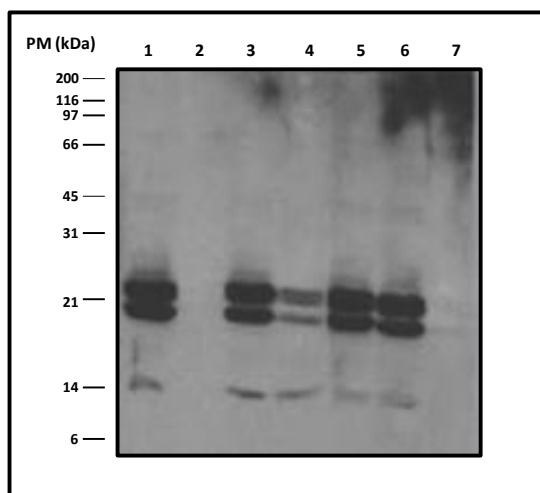
C: conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

-: suero no atópico.

#### 4.5.4.3. Ensayos de inhibición con otras especies de hámsteres.

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición utilizando los extractos de glándulas salivales de hámster Siberiano en fase sólida. Se utilizó una mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano, pre-incubados con los extractos de glándulas salivales de cada una de las cuatro especies de hámsteres analizadas en este estudio a una concentración de inhibición de 100µg/ml.

Se observó que las bandas fijadoras de IgE de alrededor 18-23 kDa permanecen sin inhibir por el pool de sueros pre-incubados con los extractos de glándulas salivales de los hámsteres común y dorado, mientras que se observó una mínima inhibición con el pool de sueros pre-incubados con el extracto de glándulas salivales de hámster Roborowski. Se confirmó que sólo se inhibían dichas bandas en su totalidad cuando se utilizó el extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano como inhibidor (**Fig. 43**).



**Fig. 43. Inmunodetección-inhibición (Western blot-inhibición) con pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano pre-incubados con extractos de glándulas salivales de las distintas especies de hámsteres incluidas.**

\* fase sólida: extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano.

1.- hámster común.

2.- hámster Siberiano.

3.- hámster dorado.

4.- hámster Roborowski.

5.- BSA (control neg. de inhibición).

6.- pool de sueros sin inhibir.

7.- suero no atópico (control negativo).

PM: marcadores de peso molecular (kDa).

## 4.6. Estudios de Proteómica.

### 4.6.1. Identificación de proteínas alergénicas mediante técnica de Espectrometría de masas.

Las secuencias peptídicas obtenidas fueron secuenciadas para cada una de las tres bandas de cada extracto estudiado de hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y las mismas fueron las siguientes:

Para la banda de 23 kDa: **NDYAELEG**, para la banda de 21 kDa: **NDYAELEG** y para la banda de 18 kDa no se obtuvo secuencia. Como forma de verificar la identificación de esta proteína se realizó una espectrometría de masas en tandem MS/MS y se obtuvo la secuencia de 2 péptidos internos siguiente: **AGQETNEMYVVGK** y **FKPVYATPENIVFTNK**.

Mediante herramientas bioinformáticas (MASCOT) y programas de búsqueda, se compararon estas secuencias peptídicas con secuencias conocidas y registradas en las bases de datos, sin que, de nuevo, se encontraran homologías, ni siquiera con las lipocalinas de roedores (*Mus m 1*, *Rat n1*, *Cav p 1*, *Cav p 2*, etc), descritas.

Tras realizar un estudio mediante técnicas proteómicas, se llegó a caracterizar de forma parcial los 14 residuos aminoácidos de la secuencia amino-terminal de dichas bandas proteica, la cual fue la siguiente: **SPFDPKELEGEWHTLR**, la cual era común en las tres, por lo que se dedujo que las tres bandas correspondían a única proteína o sus isoformas.

Tras comparar estos resultados mediante el programa Blast y la base de datos de secuencias de proteínas se observó que, sólo habían algunas concordancias con otras secuencias de péptidos descritas en otras especies de roedores, como una “odorant-binding protein” descrita en el topillo rojo (*Myodes glareolus*) y una afrodisina identificada en el hámster común o Europeo (*Cricetus cricetus*), ambas pertenecientes a la superfamilia de las lipocalinas; pero el resto de la secuencia peptídica no había sido identificada previamente, indicando que se trataba de una nueva proteína alergénica, la cual contenía en su secuencia, el típico triplete GXW en la posición 10–12, el cual está presente en la mayoría de las lipocalinas descritas<sup>61</sup> (Tabla 29).

<i>Secuencia del N-terminal</i>		Identidad (%)	Positivos (%)
<b>Secuencia péptidos</b>	<b>NDYAELEG</b>		
Odorant binding protein 3 [Myodes glareolus]	HA-----	75	75
<i>Espectrometría de masas</i>		Identidad (%)	Positivos (%)
<b>Secuencia péptidos</b>	<b>FKPVYATPENIVFT</b>		
	<b>NK</b>	69	75
Odorant binding protein 3 [Myodes glareolus]	----H---D---- ISQ		
<b>Secuencia péptidos</b>	<b>AGQETNEMYVV_GK</b>		
Aphrodisin (Lipocalin family) [Cricetus cricetus]	-----_I--A--	85	85

**Tabla 29. Espectrometría de masas de la proteína del hámster Siberiano y comparación con otras proteínas de roedores.**

#### **4.6.2. Clonación, purificación y expresión de la proteína alergénica identificada en el hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).**

##### **a.- Extracción de ARN y Generación de cDNA del gen del alérgeno de hámster Siberiano.**

Una vez extraído el ARN total de una muestra de tejido (glándulas salivales) de 2 hámsteres Siberianos, mediante homogenización mecánica y purificación utilizando el producto Pure Link® RNA mini kit, se procedió a la síntesis de la cadena complementaria del mRNA utilizando el producto SuperScript® III Reverse transcriptase y el cebador MAO330.

##### **b.- Amplificación y clonación del cDNA mediante PCR.**

Finalmente se amplificó el cDNA utilizando Taq polimerasa y los cebadores MAO329 y MAO331, según el siguiente programa: 95°C, 5' ->' → [95°C, 30" → X°C, 30" → 72°C, 2"] x30 → 72°C, 10' donde X correspondió a una temperatura de annealing comprendida en un gradiente de 40°C a 65°C (12 reacciones independientes). Se obtuvieron dos productos de PCR de aproximadamente 700 pb (pares de bases) y 500 pb respectivamente: (**Fig. 44**).

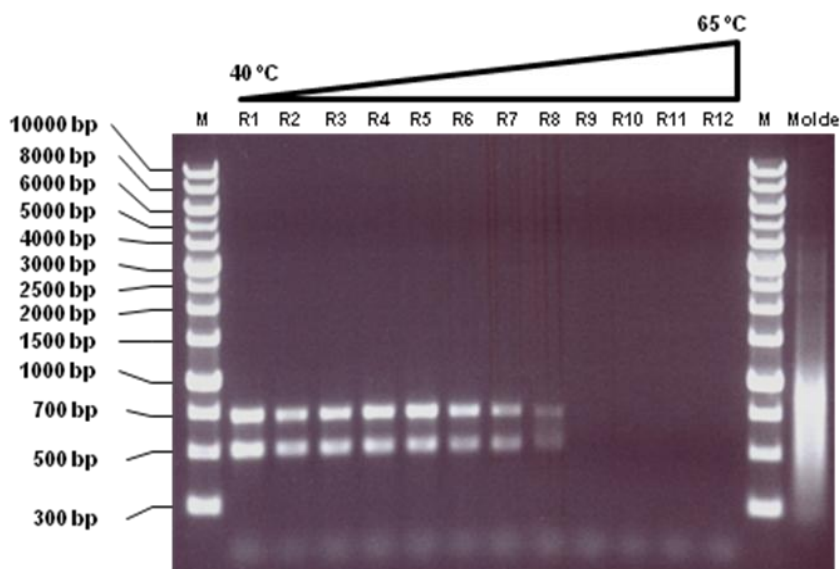


Fig. 44. PCR del cDNA del gen del alérgeno de hámster Siberiano.

#### c.- Ligación en el vector Bluescript.

El material amplificado en cada una de las reacciones R1, R2 y R3 se utilizó en mezclas de ligación independientes con el vector de clonación bacteriano pBluescript SK (+), previamente digerido con la enzima *EcoRV*.

#### d.- Transformación.

Se transformó la cepa DH5α con cada una de las mezclas de ligación, seleccionándose los transformantes en medio LB+ampicilina+X-gal. Se identificaron tres plásmidos independientes (procedentes de cada una de las reacciones R1, R2 y R3) con insertos de aproximadamente 700 pb, que fueron denominados **pBluescript-Pho-181**, **pBluescript-Pho-292** y **pBluescript-Pho-3103**, más un plásmido con un inserto de aproximadamente 500 pb que fue denominado **pBluescript-PhoS-283**.

#### e.- Secuenciación.

Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados con los cebadores T7 Fwd y T3, comprobándose en el caso de pBluescript-PhoS-181, pBluescript-PhoS-292 y pBluescript-Pho-3103 la presencia de insertos de 726 pb, 731 pb y 730 pb respectivamente (las diferencias de tamaño se deben a las de la longitud del segmento poli-A en cada caso). En el caso de pBluescript-PhoS-283, el inserto clonado resultó tener un tamaño de 513 pb.

***f.- Identificación de ORFs (Open Reading Frames).***

En los insertos de los plásmidos pBluescript-PhoS-181, pBluescript-PhoS-292 y pBluescrip Pho-3103 se identificó la misma ORF en fase con la correspondiente a la secuencia N-terminal **NDYAELEG**. En el inserto de pBluescript-PhoS-283 se identificó lo que parece ser una versión de la misma ORF con una delección interna. Esta ORF de menor tamaño no parece provenir del mismo mRNA, dada la presencia de mutaciones con respecto a la ORF de mayor tamaño.

***Proteínas.***

La ORF en los plásmidos pBluescript-PhoS-181, pBluescript-PhoS-292 y pBluescrip Pho-3103 codificaría un polipéptido con las siguientes secuencia y masa teóricas:

NDYAELEGKWDITIAIAADNDAKIKEEGPLRLYVRELYCNEDCSEMEVTFYVNANNQ  
CSKTTVIGYKQADGTYRTQFEGDNR**FQ**PVYATPENIVFT**S**KNVDRA**GOETN****LIFVV**  
**GKSQPLTPEQHEKLVEFAHENNIPEENIHVLATDTCPK.**

(17.17 kDa)

La ORF en el plásmido pBluescript-PhoS-283 codificaría un polipéptido con las siguientes secuencias y masas teóricas:

NDYAELEGDNR**FQ**PVYATPENIVFTNKNVD**AG**ETN**FL**YVVGKSQHLTPEQHEKLV  
EYAREKNIPEENIHNVLATDTCPK

(9.33 kDa)

En ambos casos se pueden identificar (subrayadas) regiones correspondientes a los péptidos internos descritos en Torres *et al.*, *Int Arch Allergy Immunol* 157: 109-112, con las diferencias indicadas en amarillo.

***g.- Amplificación y clonación de cDNA de Pho s en el vector de expresión pMAB36.***

Utilizando los cebadores **MAO334** y **MAO335**, y como DNA molde la construcción **pBluescript-PhoS-181** obtenida anteriormente, se amplificó mediante PCR un producto de 499 pb que fue digerido con las enzimas *SphI* y *HindIII* y clonado entre las mismas dianas del vector **pMABB36** (Fig. 45).

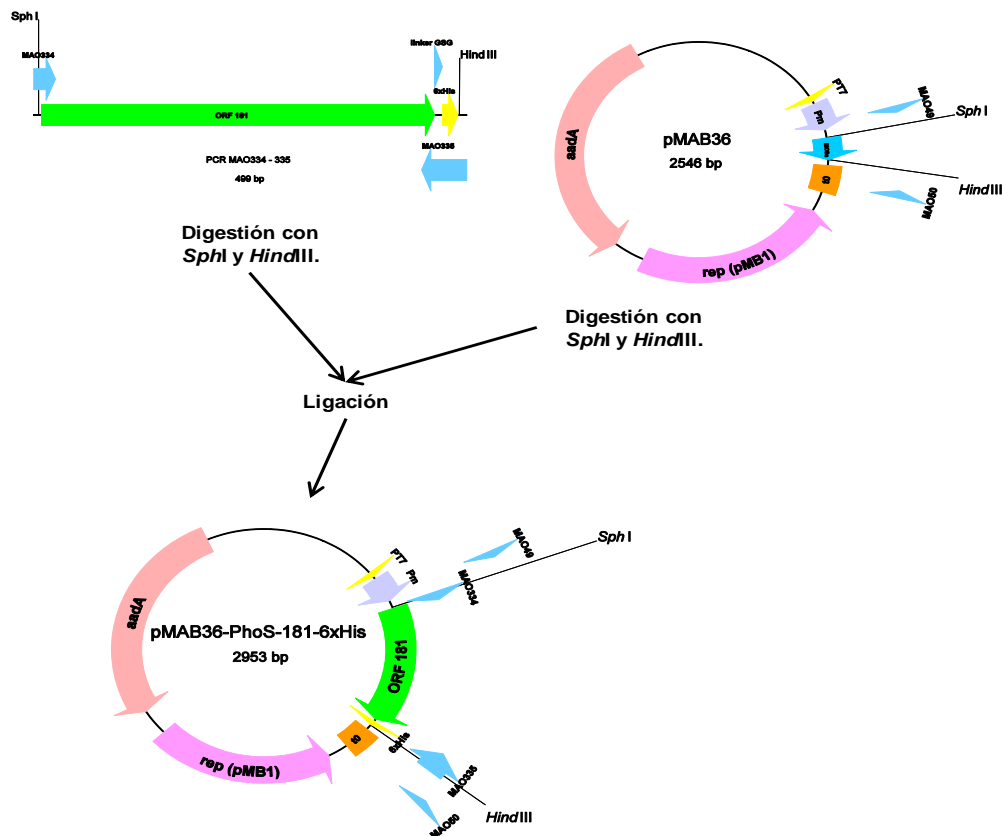


Fig. 45. Amplificación y clonación de cDNA de *Pho s* en el vector de expresión pMAB36.

#### *h.- Secuenciación.*

Un clon positivo de la construcción resultante, **pMAB36-PhoS-181-6xHis-49** fue secuenciado con los cebadores **MAO49** y **MAO50**. La construcción **pMAB36-PhoS-181-6xHis-49** permitiría la expresión recombinante, bajo el control de los sistemas T7 o *Cascade*, de manera alternativa, de una proteína de fusión PhoS-6xHis.

#### *i. Alineamiento de proteínas de algunas especies de roedores con la proteína clonada de hámster Siberiano “Phodopus sungorus pMAB36-PhoS-181 odorant-binding protein”.*

Se realizó una búsqueda en los bancos de información proteómica del NCBI (National Center of Biothecnology Information) seleccionando algunas proteínas identificadas de algunas especies de roedores filogenéticamente próximas al hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y se realizó una alineación comparativa entre las secuencias de sus cadenas de sus aminoácidos.

Pho s (*Phodopus sungorus*, hámster Siberiano).

Cri g (aphrodisin-like protein *Cricetulus griseus*: hámster Chino)

Myo g (odorant binding protein 3, *Myodes glareolus*: topillo rojo)

Afro p (aphrodisin precursor *Cricetus cricetus*, hámster común).

A M au (aphrodisin precursor *Mesocricetus auratus*, hámster dorado).

```

Pho s 1 NDYAELEGKWDITIAAADNDAKIKEEGPLRLYVRELYCNEDCSEMEVTFYVNANNQCSKT60
Cri g D-----Q-----N-VD--EK-----I--IV--D-----
Myo g HA-----T-Y-T-----VDT-E-----T-SKG-NKLG-----G-----
Afro p Q-F---Q---Y--V-----LE--E-G---F-F-HID-YKN-----I---IT-----
Af M a D-F---Q---Y--V-----LE--E-G---F-F-HID-YKN-----I---IT-----

Pho s 61 TVIGYKQADGTYRTQFEGDNRFQPVYATPENIVFTSKNVDRAGQETNLIFVVGKSQPLTP 120
Cri g K----R-----Y----T-K--H-----MAT-----RT-K--Y-A--G----S
Myo g --T--M-E--K-----D--K--H---D---I-Q-----RT-----G-----
Afro p -----LKGN---Q-----N-I---L-I-SDK-F--N--M-----M-V-A--GNA---
Af M a -----LKGN---Q-----N-I---L-I-SDK-F--N--M-----M-V-A--GNA---

Pho s 121 EQHEKLVEFAHENNIPEENIHNVLATDTCPK 151
Cri g -----K-----
Myo g --Y---E---K-Q---T---R-----E
Afro p -EN-I--Q---KK--V---L-I-----E
Af M a -EN-I--Q---KK--V---L-I-----E

```

proteína y especie	Identities	positivos
aphrodisin-like, <i>Cricetulus griseus</i> (hamster Chino)	123/151: <b>81%</b>	138/151: <b>91%</b>
odorant binding protein 3, <i>Myodes glareolus</i> (topillo rojo)	113/151: <b>75%</b>	127/151: <b>84%</b>
aphrodisin precursor, <i>Cricetus cricetus</i> (hamster común)	100/151: <b>66%</b>	121/151: <b>80%</b>
aphrodisin precursor <i>Mesocricetus auratus</i> (hámster dorado)	100/151: <b>66%</b>	121/151: <b>79%</b>

**Tabla 30. Alineamiento proteínas de algunas especies de roedores frente a la proteína clonada de hámster Siberiano “*Phodopus sungorus* pMAB36-PhoS-181 odorant-binding protein”.**

#### *j- Ensayos de expresión.*

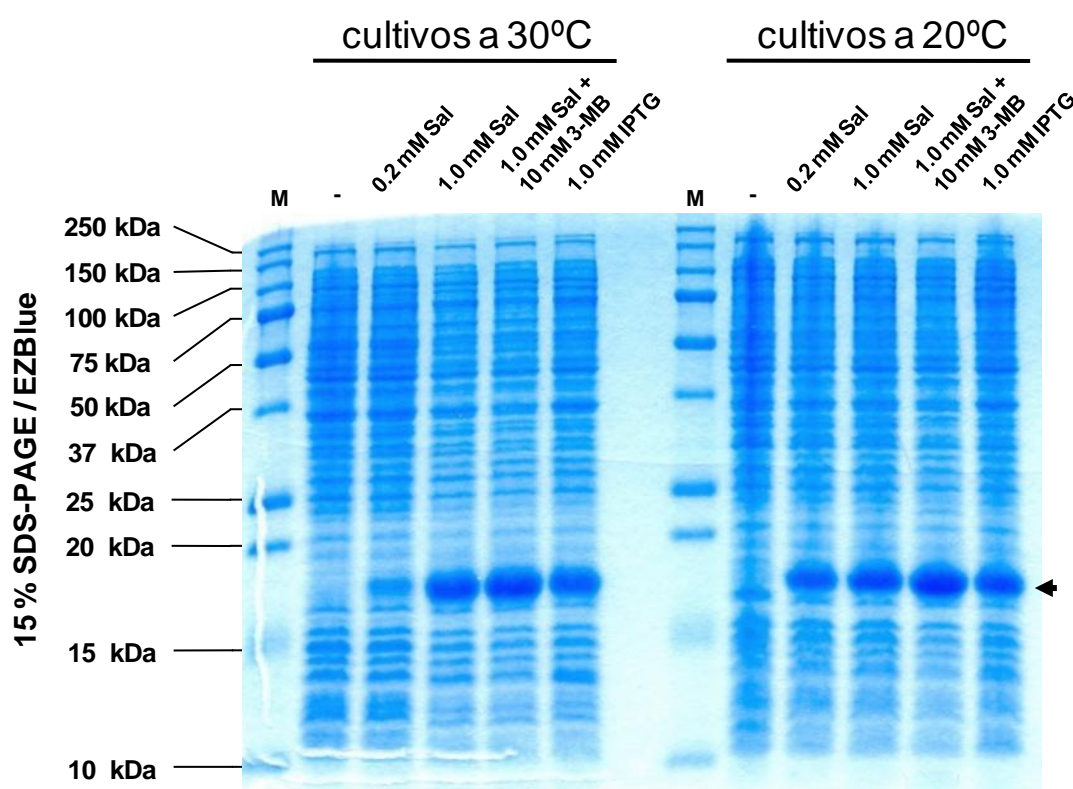
A partir de un transformante de la cepa BL21 (Des) 4S2 con el plásmido pMAB36-PhoS-181-6xHis-49 seleccionado en medio LB+25 mg kanamicina /l + 50mg estreptomycin /l, se inoculó un cultivo de 1000 ml en medio TB + 50mg estreptomycin /l que se incubó a 37°C y 200 rpm en un matraz de 5000 ml de capacidad, hasta que alcanzó una D.O.<sub>600nm</sub> =0.75. En este punto se separaron alícuotas de 100 ml de cultivo en matraces de 1000 ml de capacidad con deflectores, a las que se añadieron los inductores del sistema T7 (1 mM IPTG) o del sistema *Cascade* (0,2 mM salicilato, 1 mM salicilato, o 1 mM salicilato + 10 mM 3-metilbenzoato) y se continuaron incubando a 30°C (durante 5 horas) o a 20°C (durante toda la noche).

Como controles negativos, se incubaron en paralelo alícuotas de 50 ml del cultivo inicial en matraces de 500 ml de capacidad, en ausencia de inductores. Al final de cada incubación se recogieron las células de 1 ml de casa cultivo que se resuspendieron e hirvieron en un volumen de SB1X (sample buffer) proporcional a la D.O.<sub>600 nm</sub> final alcanzada, de acuerdo con la tabla siguiente (**Tabla 31**):

	Cultivos									
	Cultivo No Inducido		Cultivo Inducido 0.2 mM sal		Cultivo Inducido 1.0 mM sal		Cultivo Inducido 1.0 mM sal + 10 mM 3-MB		Cultivo Inducido 1.0 mM IPTG	
Temperatura de inducción	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C
DO <sub>600nm</sub> Final	7.52	11.00	6.09	8.49	3.25	4.78	1.61	2.51	2.42	2.86
Volumen de 1xSB usado en la lisis	752 µl	1100 µl	609 µl	849 µl	325 µl	478 µl	161 µl	251 µl	242 µl	286 µl

**Tabla 31. Cultivos de los ensayos de expresión.**

Se analizaron 5 µl de cada muestra mediante SDS-PAGE 15% y tinción con reactivo EZBlue con los siguientes resultados (**Fig. 46**):



**Fig. 46. SDS-PAGE 15% de los cultivos de los ensayos de expresión.**

Los resultados mostraron la sobreexpresión de una proteína de tamaño compatible con el teórico de la fusión PhoS-6xHis, en todas las condiciones de inducción.

Con el fin de determinar la presencia de la fusión PhoS-6xHis en las fracciones soluble e insoluble, se recogieron mediante centrifugación las células de 50 ml de cuatro de los cultivos, y se lisaron en 20 ml de tampón de lisis (PBS pH 7.0 suplementado con 50 unidades/ml de DNasa 1 y 10 mM MgCl<sub>2</sub>, más un inhibidor comercial de proteasas (Complete ROCHE), utilizando un homogenizador GEA Niro, modelo NS1001L PANDA a una presión de 800-900 bar.



El lisado obtenido se centrifugó a 10000 xg durante 15 min a 4°C y se reservó el sobrenadante (Fracción Soluble, FS). El sedimento resultante se lavó 2 veces con 100 mM Tris-Cl ph 8.0, y se resuspendió en el mismo volumen del cultivo de partida de 100 mM Tris-Cl ph 8.0 + 2% SDS (Fracción insoluble, FI).

Las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE 15% con tinción EZBlue (Fig. 47), con los resultados que mostraron que la proteína PhoS-6xHis se encuentra predominantemente en la fracción soluble de los lisados de los cultivos.

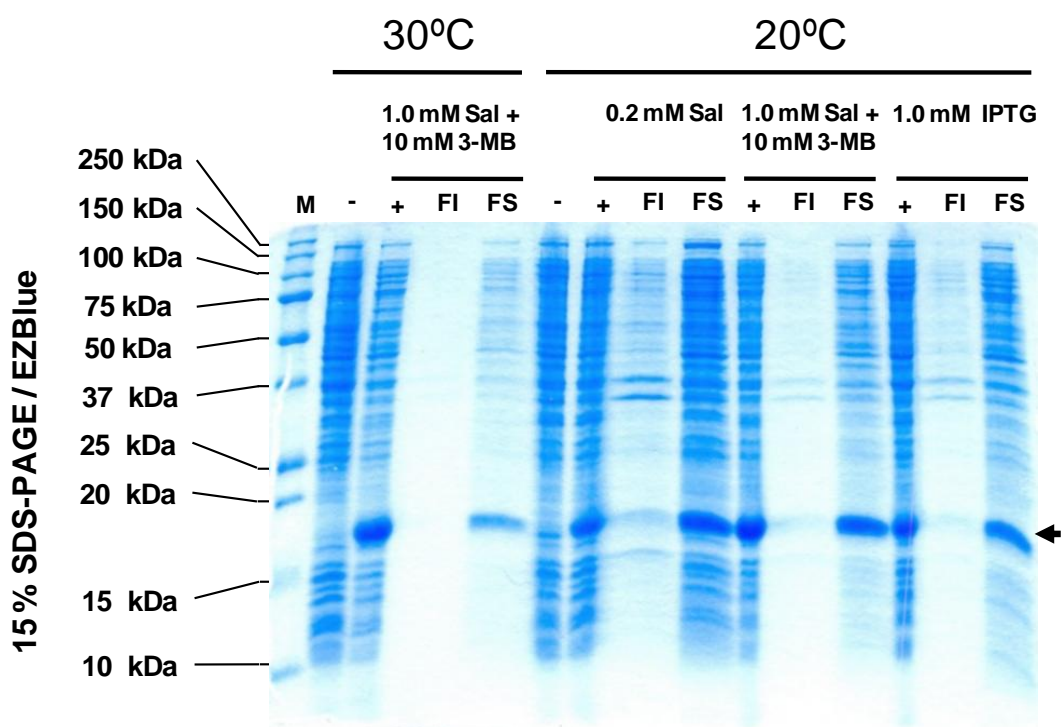


Fig. 47. SDS-PAGE fracción soluble de los ensayos de expresión de la proteína recombinante obtenida PhoS-6xHis.

#### k. Ensayos de purificación.

Una vez verificada la presencia de la fusión PhoS-6xHis en la fracción soluble de los cultivos, se llevó a cabo un ensayo de purificación de la proteína recombinante a partir del cultivo inducido a 20°C con 1 mM salicilato + 10 mM-3 metilbenzoato.

Para ello, se obtuvo la fracción soluble de las células de 50 ml de dicho cultivo, recogidas y resuspendidas en el mismo volumen de PBS ph 8.0. La fracción soluble se aplicó a una columna con 0,5 ml de resina IMAC equilibrada con buffer de equilibrado/lavado (20 mM fosfato potásico pH 8.0, 100 mM NaCl) con concentraciones crecientes de imidazol: 25 mM (E1), 50 mM (E2), 75 mM (E3), 100 mM (E4), 125 mM (E5), 150 mM (E6), 200 mM (E7), 250 mM (E8), 300 mM (E9) y 500 mM (E10). Se analizaron 15 µl de cada fracción de elución mediante SDS-PAGE 15% con tinción EZBlue y Western blot con anticuerpos anti-6xHis con los siguientes resultados (Fig. 48):

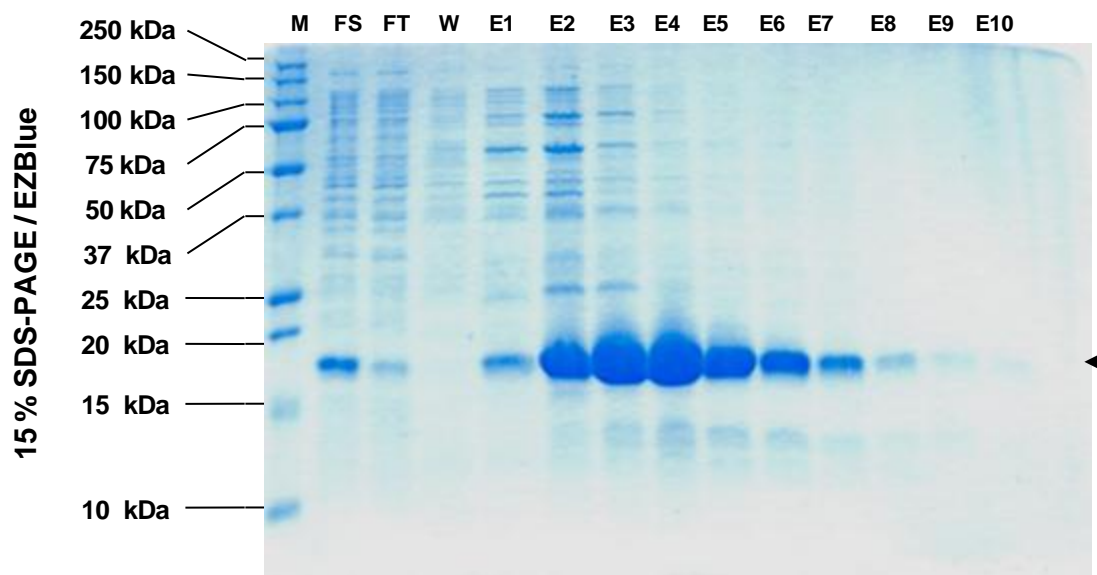


Fig. 48. SDS-PAGE 15% de los ensayos de purificación proteína recombinante obtenida *PhoS-6xHis*.

#### 1. Cuantificación de la proteína recombinante de hámster Siberiano.

Se realizó una curva patrón partiendo de una concentración de BSA 2mg/ml, realizándose diluciones a la mitad hasta una concentración de 0,0625 mg/ml. Se utilizó reactivo de azul de Coomassie para la lectura de la placa a una absorbancia de 620 nm de longitud de onda. La concentración de proteínas fue de: **5,44 µg/µl**.

### 4.7. Estudios “in vitro” con la proteína recombinante de hámster Siberiano.

#### 4.7.1. Ensayos de Inmunodetección con la proteína recombinante de hámster Siberiano mediante Western blot.

Se realizó una inmunodetección utilizando mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano, en la que se analizaron algunas fracciones de la secuencia de la proteína recombinante de hámster Siberiano obtenida mediante clonación. Se observó la presencia de una banda fijadora de IgE con un peso aproximado de 21 kDa tanto en la fracción de cultivo inducido, como en las fracciones de elución 3 y 4 (**Fig. 49**).

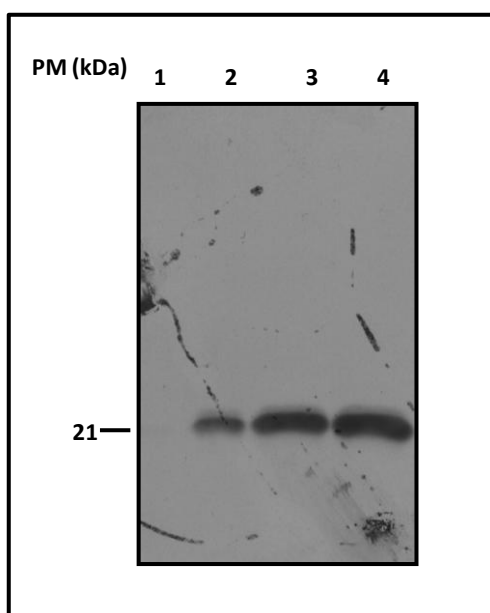
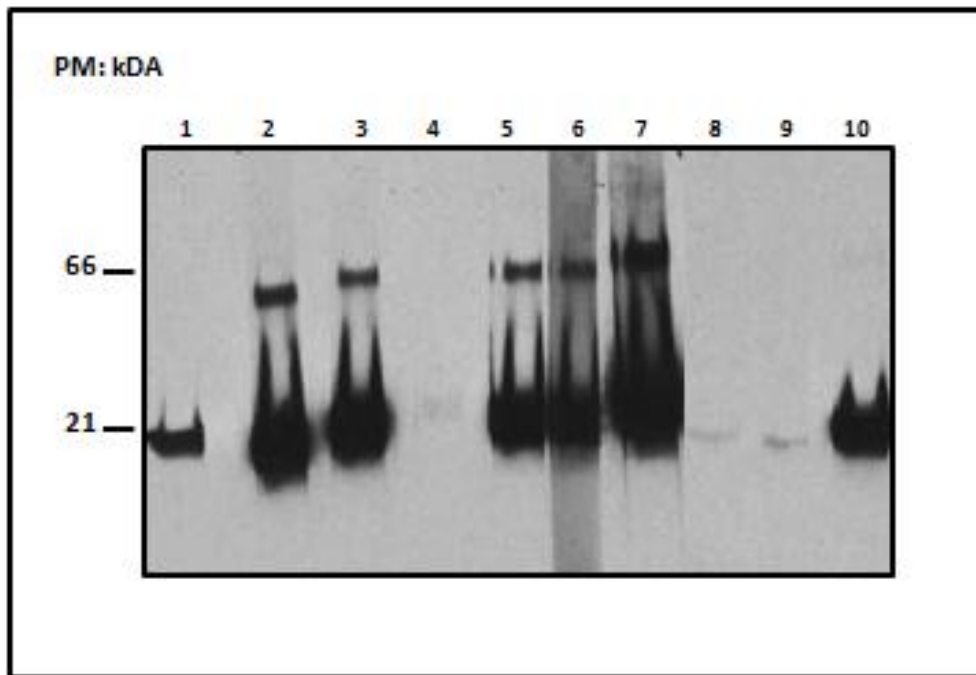


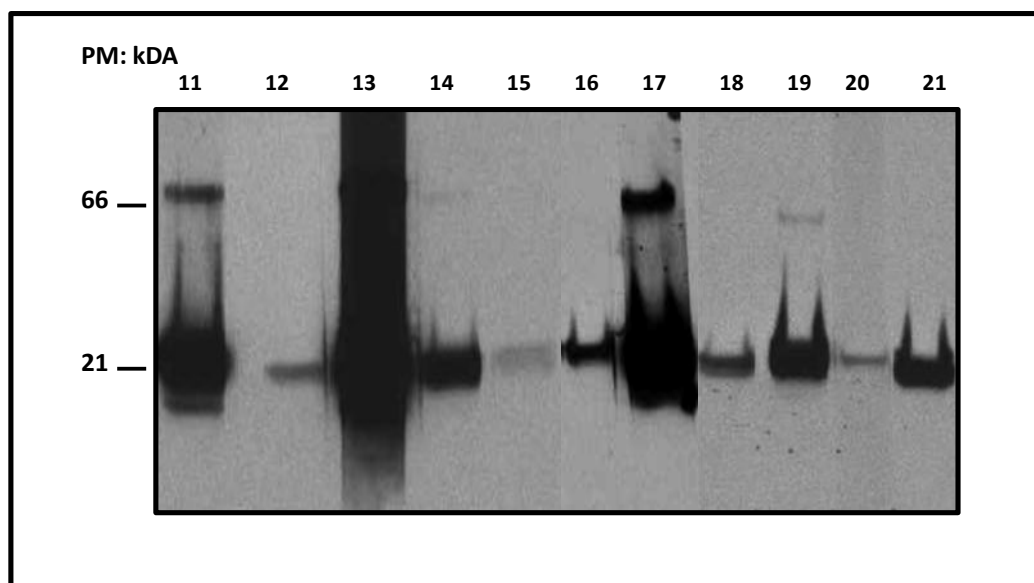
Fig. 49. Inmunodetección (Western blot) de pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano frente a proteína recombinante de hámster Siberiano obtenida (*rPhoS*)

1: cultivo no inducido  
2: cultivo inducido  
3: fracción de elución 3  
4: fracción de elución 4  
PM: marcadores de peso molecular (kDa).

Posteriormente se realizó un ensayo de inmunodetección con la proteína recombinante de hámster Siberiano frente a cada uno de los sueros de los pacientes incluidos en el estudio (Fig. 50-51).



**Fig. 50. Inmunodetección (Western blot) sueros 1-10 pacientes alérgicos a hámster Siberiano frente a la proteína recombinante de hámster Siberiano.**

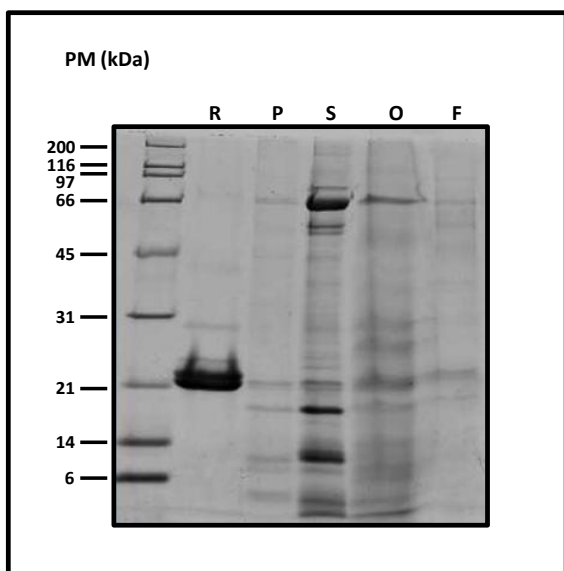


**Fig. 51. Inmunodetección (Western blot) sueros 11-21 pacientes alérgicos a hámster Siberiano frente a la proteína recombinante de hámster Siberiano.**

Tras el revelado se pudo observar que la totalidad de los pacientes reconocían, con distinta intensidad, una banda de alrededor 21 kDa, correspondiendo al mismo peso de la banda identificada en los ensayos realizados con los extractos nativos de pelo, glándulas salivales y de orina del hámster Siberiano. Del mismo modo se observó que los sueros de 9 pacientes (42%) reconocieron una banda de 66-67 kDa.

#### 4.7.2. Ensayos SDS-PAGE e inmunodetección mediante Western blot con suero de paciente de Test de exposición.

Se realizó en primer lugar, una electroforesis SDS-PAGE al 14% en condiciones reductoras con los extractos de las distintas fuentes estudiadas, incluida una muestra obtenida del filtro del Air Sentinel, la cual fue procesada y cuantificada tal como se ha descrito anteriormente. La tinción de azul de Coomasie reveló la presencia de múltiples bandas proteicas con una masa molecular comprendida entre los 6 y 97 kDa aproximadamente, en cada uno de los distintos extractos y el del filtro del Air Sentinel (**Fig. 52**).



**Fig. 52. SDS-PAGE con extractos alergénicos de hámster Siberiano y muestras de filtro de Air sentinel.**

R: proteína recombinante de hS.

P: pelo.

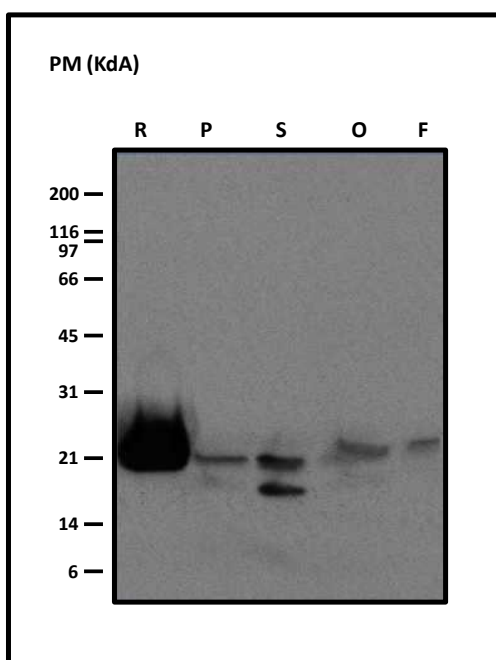
S: glándulas salivales.

O: orina.

F: filtro Air sentinel.

PM: marcadores de peso molecular (kDa).

A continuación se realizó una inmunodetección (Western blot) utilizando el suero de la paciente a la que se le realizó el Test de Exposición frente a los extractos de las tres fuentes alergénicas estudiadas (pelo, glándulas salivales y orina), además de la muestra recogida en el filtro colocado en el Air Sentinel. Se pudo observar que el suero de la paciente reconocía unas bandas fijadoras de IgE entre 18-23 kDa en cada uno de los extractos alergénicos de hámster Siberiano, incluido el del filtro del Air Sentinel (**Fig. 53**).



**Fig. 53. Inmunodetección (Western blot) con suero paciente tras test de exposición frente a extractos de fuentes alergénicas de hámster Siberiano.**

R: proteína recombinante de hámster Siberiano.

P: pelo.

S: glándulas salivales.

O: orina.

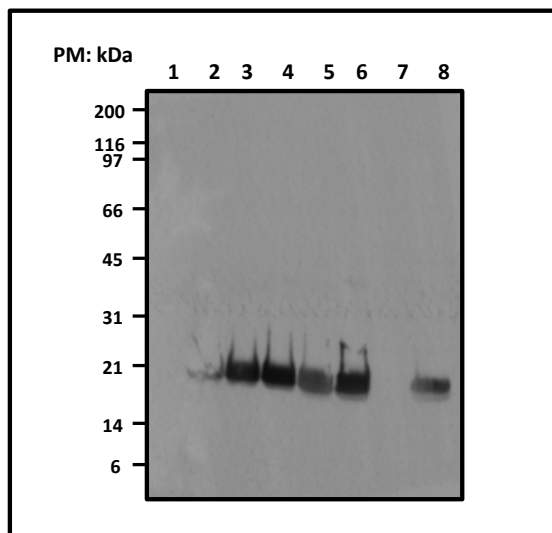
F: filtro Air sentinel

PM: marcadores de peso molecular (kDa).

#### 4.7.3. Ensayo de reactividad cruzada entre la proteína recombinante de hámster Siberiano (*rPho s*) y proteínas nativas de otras especies de hámsteres incluidos.

Se realizó un ensayo de inhibición utilizando la proteína recombinante de hámster Siberiano en fase sólida. Se utilizó una mezcla (pool) de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano, pre-incubados con los extractos de glándulas salivales de cada una de las cuatro especies de hámsteres analizadas en este estudio: hámster Siberiano, hámster común, hámster dorado y hámster Roborowski a una concentración de inhibición de 100µg/ml (**Fig. 54**).

Se comprobó que las bandas fijadoras de IgE con peso aproximado de 18-23 kDa fueron inhibidas tanto por la misma proteína recombinante como por el extracto nativo de glándulas salivales del hámster Siberiano, sin embargo, no hubo inhibición frente a los sueros pre-incubados con los extractos de glándulas salivales de hámster común y dorado respectivamente. Mientras que, se observó una moderada inhibición en el caso del extracto de glándulas salivales de hámster Roborowski.



**Fig. 54. Inmunodetección-inhibición (Western blot-inhibición) de con pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano pre-incubados con extractos de glándulas salivales de las distintas especies de hámsteres incluidas.**

- 1.- proteína recombinante de hS.
  - 2.- hámster Siberiano.
  - 3.- hámster común.
  - 4.- hámster dorado.
  - 5.- hámster Roborowski.
  - 6.- BSA (control neg. de inhibición).
  - 7.- suero no atópico (control negativo).
  - 8.- pool de sueros sin inhibir.
- PM: marcadores de peso molecular (kDa).

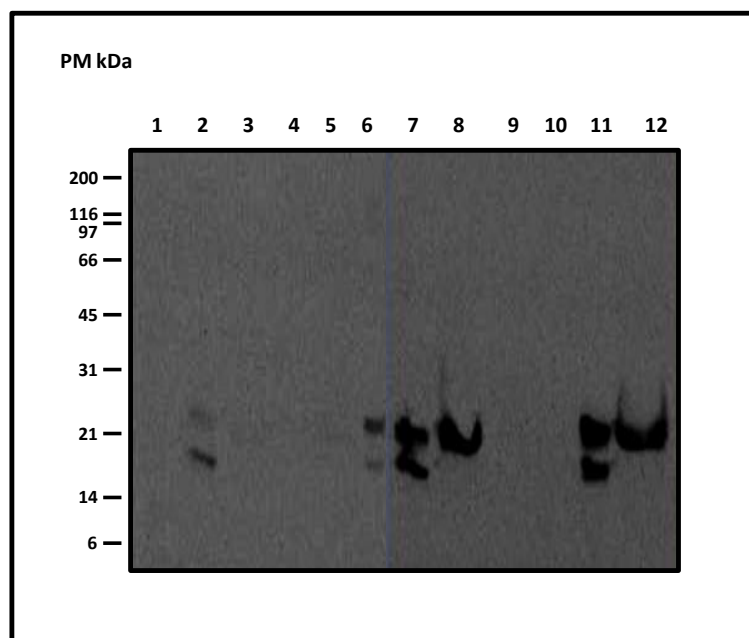
#### 4.7.4. Ensayo de Reactividad cruzada entre extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano y hámster Roborowski frente a proteína recombinante de hámster Siberiano.

En el siguiente ensayo de inhibición se utilizaron tanto extracto de saliva de hámster Siberiano como de hámster Roborowski en fase sólida de forma paralela para enfrentarlos a una mezcla (pool) de sueros pre-incubados de igual forma paralela con extractos de la proteína recombinante de hámster Siberiano (*rPho s*) y los extractos de saliva de ambas especies de hámsteres que fueron utilizados como inhibidores a una concentración de inhibición de 100 µg/ml.

En el carril 1 se observó que la proteína recombinante de hámster Siberiano inhibía en su totalidad al extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano, mientras que en el carril 2 el extracto de proteína recombinante de hámster Siberiano inhibía parcialmente la saliva del hámster Roborowski.

En los carriles 3 y 4 se confirmó que los extractos de saliva de hámster Siberiano y de hámster Roborowski se inhibían en su totalidad frente a los extractos de saliva de hámster Siberiano y hámster Roborowski respectivamente.

Y finalmente, en el carril 5 se vió que la saliva del hámster Roborowski inhibía totalmente a la saliva del hámster Siberiano, mientras que en el carril 6 la saliva del hámster Siberiano inhibía parcialmente la saliva del hámster Roborowski, ocurriendo de forma similar al carril 2 (Fig. 55).



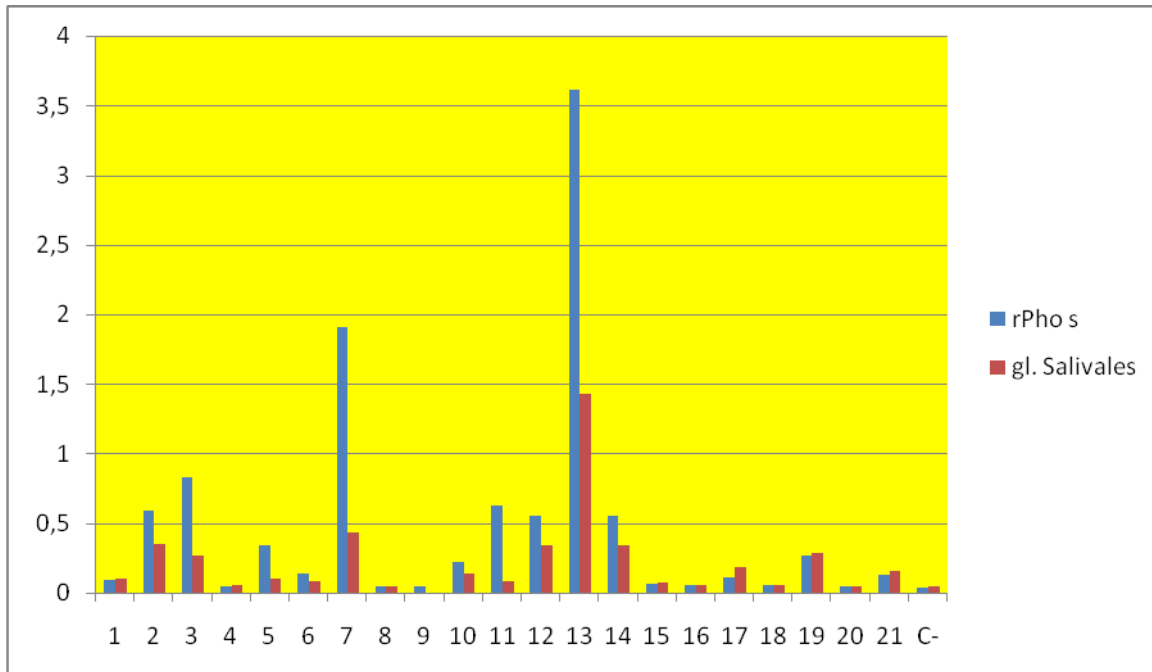
**Fig. 55. Inmunodetección-inhibición (Western blot-inhibición) con pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano pre-incubados con extractos de saliva de proteína recombinante de hámster Siberiano y Roborowski.** carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 fase sólida hámster Siberiano. carriles 2, 4, 6, 8, 10, y 12 fase sólida hámster Roborowski. 1.- sueros pre-incubados con proteína recombinante de hámster Siberiano. 2.- sueros pre-incubados con proteína recombinante de hámster Siberiano. 3.- sueros pre-incubados con extracto de saliva de hámster Siberiano. 4.- sueros pre-incubados con extracto de saliva de hámster Roborowski. 5.- sueros pre-incubados con extracto de saliva de hámster Roborowski. 6.- sueros pre-incubados con extracto de saliva de hámster Siberiano. 7.- sueros pre-incubados con BSA (control negativo de inhibición). 8.- sueros pre-incubados con BSA (control negativo de inhibición). 9.- sueros pre-incubados con suero no atópico (control negativo). 10.- sueros pre-incubados con suero no atópico (control negativo). 11.- pool de sueros sin inhibir. 12.- pool de sueros sin inhibir. PM: marcadores de peso molecular (kDa).

#### 4.7.5. Ensayos de Inmunodetección con extracto nativo de glándulas salivales y de la proteína recombinante de hámster Siberiano mediante inmunoensayo ELISA.

Se tapizó una placa de ELISA con los extractos nativo de glándulas salivales de hámster Siberiano y de la proteína recombinante a una concentración de 10µg/100µl en un volumen de 100 µl de muestra por pocillo.

Se utilizó PBS 1X como tampón de dilución en los pocillos de las muestras de proteínas y en los pocillos control. Se realizaron las incubaciones, lavados correspondientes y bloqueo de la placa tal como se ha explicado en la metodología.

Se realizó la incubación de la misma con los 21 sueros de los pacientes incluidos más uno de paciente no atópico utilizado como control negativo. Se incubó durante una hora con 100µl por pocillo de un anticuerpo policlonal secundario anti-IgE humana conjugado en peroxidasa obtenido de cabra ( $\alpha$ -antiIgE-GaHu-PO) a una dilución 1/2500. Tras repetir los lavados se reveló la placa con Tetrametil Benzidina (TMB, sustrato ultrasensible, Chemicon) (**Fig 56**).



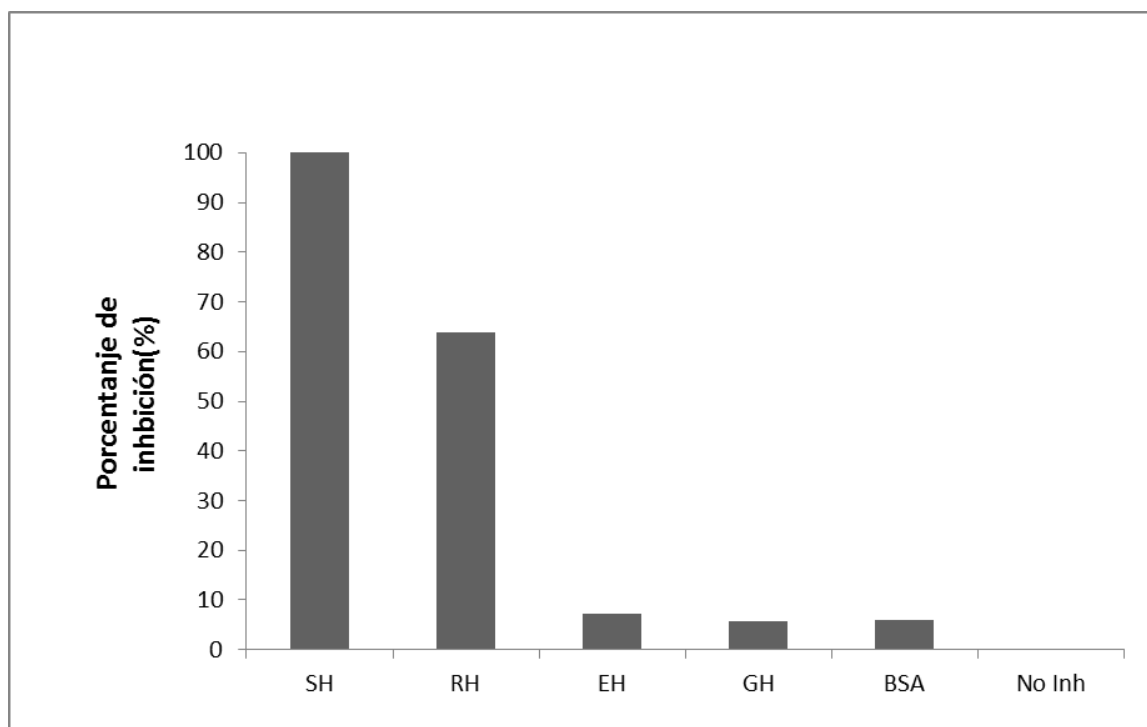
**Fig.**

**56. Inmunodetección mediante ensayo ELISA frente a proteína recombinante de hámster Siberiano y extracto nativo de glándulas salivales de hámster Siberiano.** rPho s: extracto de proteína recombinante de hS. gl. salivales: extracto nativo de glándulas salivales de hS.

Se observó que frente a ambos extractos analizados hubo una fijación IgE-específica de todos los sueros de los pacientes incluidos en distinto grado de absorbancia.

#### 4.7.6. Ensayos de Reactividad cruzada mediante técnica de inhibición de inmunoensayo ELISA.

Se preparó un inmunoensayo de ELISA-inhibición, para el cual se incubaron los pocillos pre-fijados con el extracto de proteína recombinante de hámster Siberiano y se realizó la inhibición con muestras de suero pre-incubados con los extractos de glándulas salivales de las especies de hámsteres incluidas (**Fig. 57**).



**Fig. 57. Ensayo de inhibición por ELISA extractos de proteína recombinante de hámster Siberiano.**

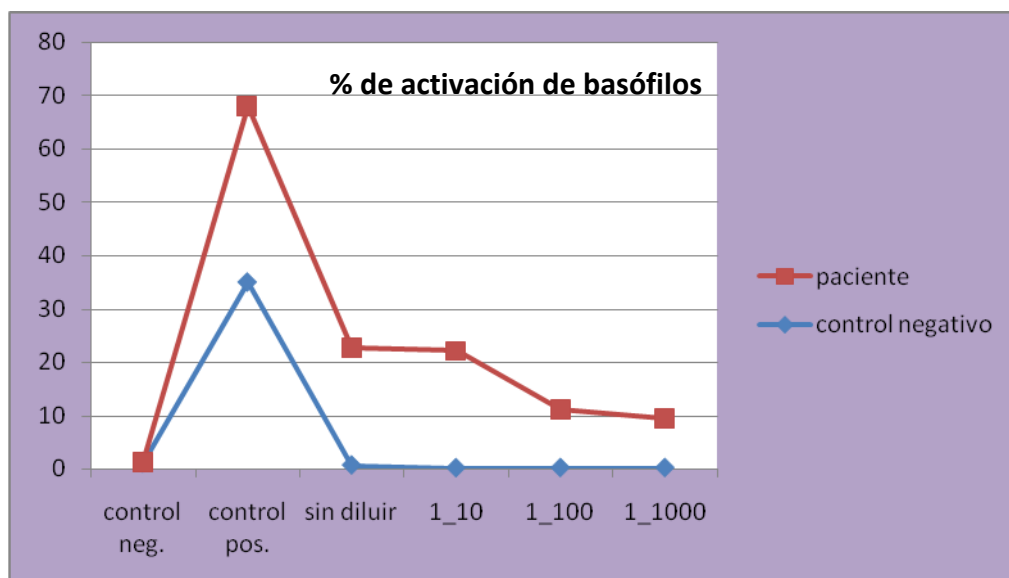
**SH:** proteína recombinante de hámster Siberiano inhibida con pool de sueros pre-incubados con extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano (Siberian hamster). **RH:** proteína recombinante de hámster Siberiano inhibida con pool de sueros pre-incubados con extracto de glándulas salivales de hámster Roborowski (Roborowski hamster). **EH:** proteína recombinante de hámster Siberiano inhibida con pool de sueros pre-incubados con extracto de glándulas salivales de hámster Europeo (European hamster). **GH:** proteína recombinante de hámster Siberiano inhibida con pool de sueros pre-incubados con extracto de glándulas salivales de hámster dorado (Golden hámster). **BSA:** proteína recombinante de hámster Siberiano inhibida con pool de sueros pre-incubados con BSA (albúmina sérica bovina), control negativo: **No inh:** proteína recombinante de hámster Siberiano inhibida con pool de sueros pre-incubados sin inhibir.

Este ensayo nos reveló que la proteína recombinante del hámster Siberiano es inhibida en el 100% por el extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano, mientras que el extracto de glándulas salivales del hámster Roborowski la inhibe de forma parcial en hasta un 64%. En el caso del hámster Europeo o común y el hámster dorado, la inhibición de la proteína recombinante de hámster Siberiano ocurre en un 8% y 5% respectivamente.

#### **4.7.7. Test de activación de basófilos (Basotest®).**

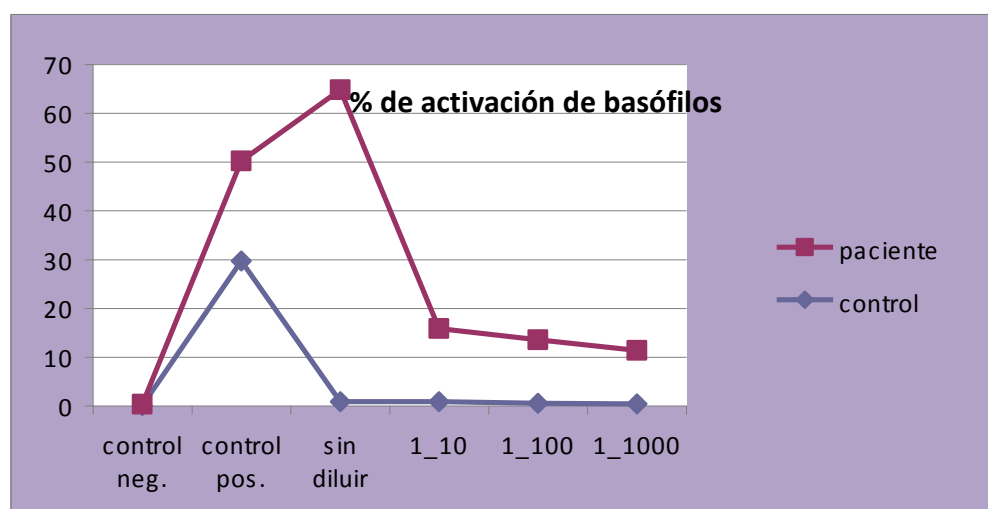
Se llegó a alcanzar una activación de basófilos de hasta un 22% en el caso del extracto nativo de glándulas salivales de hámster Siberiano sin diluir, utilizando el suero de la paciente. La activación fue disminuyendo progresivamente según las diluciones realizadas con el extracto. En el suero del paciente control no atópico hubo una activación de menos de un 1% (**Fig. 58**).





**Fig. 58. Test de activación de basófilos en paciente control no atópico y paciente alérgico a hámster Siberiano frente a extracto nativo de glándulas salivales de hámster Siberiano.**

Se llegó a alcanzar una activación de basófilos de hasta un 64% en el caso de la proteína recombinante de hámster Siberiano sin diluir, utilizando el suero de la paciente. La activación fue disminuyendo progresivamente según las diluciones realizadas con el extracto. En el suero del paciente control no atópico hubo una activación de menos de un 1%. (**Fig. 59**).



**Fig. 59. Test de activación de basófilos en paciente control no atópico y paciente alérgico a hámster Siberiano frente a la fracción 4 de la proteína clonada del hámster Siberiano.**

# ***DISCUSIÓN***



## DISCUSIÓN

### **5.1. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano.**

De los 21 pacientes incluidos en este estudio, 14 (66,7%) correspondieron a mujeres y 7 (33,3%) a hombres (**Fig. 3**). La relación encontrada mujer-hombre fue de 2:1, dato similar al encontrado por Niitsuma y cols.<sup>113</sup> en su estudio donde observaron una proporción mujer-hombre de 1:1,3, mientras que en las series de Desjardins A. y cols.<sup>143</sup> como en la de Bertó JM *et al.*<sup>111</sup> ocurrió en igual proporción a la nuestra. En general, la diferencia por sexo se inclina ligeramente a favor del sexo femenino, pero las series estudiadas hasta el momento son muy escasas e incluyen a pocos pacientes. En el estudio de Krakowiak y cols.<sup>25</sup> donde estudiaron a 200 veterinarios que desarrollaron alergia por exposición a animales de laboratorio, encontraron 111 varones frente a 89 mujeres, por lo que se puede concluir que el sexo no parece ser un factor de riesgo para sensibilizarse y/o hacerse alérgico a hámster Siberiano y/o otros roedores.

La edad media de los pacientes incluidos fue de 27,2 años ( $\pm 10$ -46), mientras que en otro estudio de Niitsuma T. y cols. describen un promedio de edad de 37,7 años<sup>114</sup> y en el estudio de Bertó y cols. un rango de edad comprendido entre los 19-44 años<sup>111</sup>. Por lo que se deduce de las escasas series publicadas que la patología alérgica por exposición a hámster Siberiano, es una patología de niños y adultos jóvenes, lo cual no deja de ser importante desde el punto de vista de la morbilidad que conlleva desarrollar desde la juventud síntomas alérgicos por exposición a mascotas dentro del hogar<sup>143</sup>.

En nuestra serie estudiada la mayoría de los pacientes (71,4%) desarrollaron síntomas de asma, un menor grupo sólo rinoconjuntivitis (23,8%) y sólo 1 paciente (4,8%) presentó una reacción de anafilaxia por mordedura de hámster Siberiano (**Fig. 4**), que ya ha sido descrita en algunas series.<sup>112,113,115</sup> La causa principal de visitas a Urgencias (**Fig. 33-34**) en nuestros pacientes fue por reagudización asmática relacionada con la exposición al/a los hámster/es dentro de su domicilio, en un 87,5% de los pacientes, lo cual habla de la intensidad de los síntomas causados tras la sensibilización al mismo. Niitsuma T y cols. presentaron una serie de 30 casos de pacientes expuestos a hámster Siberiano, de los que 22 pacientes no tenían historia previa de asma y sólo 8 pacientes presentan agudización de sus síntomas de asma tras exponerse a hámster Siberiano<sup>114</sup>. En la serie de Bertó y cols. 6 pacientes tenían historia de asma por exposición a hámster Siberiano<sup>111</sup>. En el estudio de Niitsuma y cols. no describen la rinoconjuntivitis como síntoma importante desarrollado por exposición a hámster Siberiano, lo cual casi siempre precede, en nuestra experiencia al desarrollo de los síntomas de asma o aparecen de forma paralela. También destaca que, tanto en nuestro estudio como en los de otros autores, no hubiese ningún paciente con síntomas de urticaria de contacto, como se ha descrito en muchos artículos de alergia ocupacional con animales<sup>144,145</sup>.

Nueve de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano (42,8%) (**Fig. 7**) estudiados eran polínicos, lo que nos refleja el grado de atopia de los pacientes de nuestra serie. El estudio de Bertó *et al.* reflejó una serie de 6 pacientes que presentaron síntomas respiratorios por exposición a hámster Siberiano, dentro de éstos, encontraron que 3 pacientes estaban sensibilizados exclusivamente a hámster Siberiano, mientras que el resto además estaban sensibilizados a otros alérgenos ambientales comunes<sup>111</sup>. Desjardins A. y cols. describieron una importante asociación entre pacientes con 3 o más pruebas cutáneas positivas a alérgenos comunes con la positividad de las pruebas cutáneas a epitelios de animales<sup>143</sup>. Sin embargo,

en el estudio de Krakowiak y cols.<sup>25</sup> observaron que la atopia no era reconocida como un factor de riesgo necesario para el desarrollo de alergia a animales de laboratorio.

La mayoría de pacientes estudiados (71%) presentaron un tiempo de latencia de síntomas respiratorios entre 4-12 semanas (1-3 meses) (**Fig. 5**). Nuestros resultados se asemejan a los encontrados en el estudio de Bertó y cols., donde observan que 3 de los pacientes presentaron un tiempo de latencia de entre 1 a 3 meses tras exposición a hámster Siberiano<sup>111</sup>. Esto parece indicar que los alérgenos del hámster Siberiano tienen una potencia sensibilizante importante y que, según hemos comprobado estadísticamente, hay una mayor probabilidad de tener un mayor número de sensibilizaciones a un menor tiempo de latencia (**Tabla 4**), de lo que también se puede deducir que, a menor tiempo de latencia, mayor probabilidad presentar síntomas clínicos (**Tabla 5**).

Dieciocho de los 21 pacientes estudiados (85,7%) habían tenido síntomas alérgicos por exposición previa a otros animales en su domicilio; (**Fig. 6**). De acuerdo a otros estudios, ser alérgico a animales previamente es un factor de riesgo para desarrollar alergia ocupacional por exposición a animales de laboratorio, entre ellos a roedores<sup>25</sup>. Sin embargo este aspecto no aparece reflejado en el caso de exposición a roedores como mascotas dentro de los hogares. Spitzauer y cols.<sup>99</sup> demostraron que muchas personas alérgicas a perros y gatos, podrían desarrollar nuevos síntomas alérgicos por exposición a otros animales. Por lo tanto, se debe alertar del riesgo que existe de sensibilizarse y/o desarrollar alergia al hámster Siberiano si se es alérgico a otros animales previamente, como las mascotas tradicionales perro y gato. Este dato podría deberse a la reactividad cruzada que existe entre alérgenos comunes en animales mamíferos como es el caso de las albúminas<sup>99</sup> o bien por su propia capacidad sensibilizante.

En las pruebas cutáneas realizadas en los pacientes estudiados con los distintos extractos de hámsteres encontramos que 11 estaban monosensibilizados a hámster Siberiano y 7 además presentaban sensibilización a hámster Roborowski (**Tabla 6**). Este dato es importante porque refleja que, aunque los pacientes en el momento de la inclusión sólo habían estado expuestos a hámster Siberiano exclusivamente, la positividad tan alta en las pruebas con el hámster Roborowski podría traducirse en una posible reactividad cruzada entre ambas especies y más sabiendo que taxonómicamente son especies muy próximas. De igual forma, aunque sólo observamos 2 pacientes sensibilizados a hámster Siberiano, hámster común o Europeo y hámster Roborowski y 1 paciente sensibilizado a hámster Siberiano y a hámster común o Europeo, se podría afirmar lo mismo. No obstante, en el estudio presentado por Cedena y cols.<sup>119</sup> encontraron una gran similitud inmunológica entre las especies de hámster común o Europeo y el hámster dorado, aunque no se comparó con el hámster Siberiano. De todas formas cabría la posibilidad de pensar que la presencia de albúminas, sobre todo en el pelo de todas las especies de hámsteres estudiadas en este trabajo, podría ser el alérgeno responsable de reactividad cruzada, aun cuando cada especie de hámster tuviese sus alérgenos propios.

Dieciocho pacientes (85,7%) resultaron estar sensibilizados a los tres extractos alérgicos del hámster Siberiano (pelo, glándulas salivales y orina), (**Tabla 6**) esto nos indica la potencia alérgica de estas proteínas presentes en las tres fuentes alérgicas. En la literatura revisada en todos los casos presentados de pacientes alérgicos a hámster Siberiano se ha utilizado el pelo del hámster Siberiano para la realización de las pruebas cutáneas, y por ende, los resultados que se presentan se refieren a la sensibilización exclusiva a esta fuente alérgica<sup>111,113</sup>, mientras que en nuestro estudio, hemos utilizado por primera vez extractos nativos obtenidos a partir de glándulas salivales y de orina, con la finalidad de comprobar la

actividad biológica e inmunogénica ya que éstas y otras fuentes han sido mencionadas en muchos de los trabajos realizados con otros animales<sup>147</sup>.

Tras la determinación de IgE específica para alérgenos recombinantes de perro, gato y caballo, encontramos que un total de 6 pacientes (28,6%) presentaron una IgE específica para albúmina (**Tabla 7**). Este valor encontrado se aproxima a lo que está descrito en varios estudios, donde se afirma que las albúminas séricas, caracterizadas por tener un peso molecular de 66-67 kDa, son reconocidas por hasta el 30% de los pacientes alérgicos a animales mamíferos<sup>146,147</sup> y además, pueden ser responsables de los fenómenos de reactividad cruzada entre mamíferos.

En el caso particular de los pacientes sensibilizados a gato comprobamos que 10 de los 21 pacientes (47,6%) alérgicos a hámster Siberiano incluidos estaban sensibilizados a rFel d 1, una uteroglobina y el alérgeno principal del gato (**Tabla 8**).<sup>148</sup> Hubo 5 pacientes (23,8%) que estaban sensibilizados a rCan f 1 y ninguno sensibilizado a rCan f 2, ambos producidos en la saliva del perro, como tampoco a rCan f 4 ni a rCan f 5, que son alérgenos minoritarios del perro<sup>149</sup>. Tres pacientes reconocían el alérgeno recombinante Equ c 1, dos de ellos sensibilizados solamente, y el otro paciente con alergia clínica a caballo. Equ c 1 es el alérgeno más importante del caballo correspondiendo a una lipocalina que guarda una similitud de alrededor del 50% con la principal proteína urinaria (MUP) de roedores<sup>150</sup>. Sólo en el estudio de Saarelainen y cols.<sup>151</sup> se hace mención a la reactividad cruzada entre Equ c 1 y el alérgeno mayoritario de ratón Mus m 1, que a pesar de que son especies de animales taxonómicamente muy distantes, su secuencia aminoácida es parecida. Sin embargo, no existen estudios que comparen y/o reflejen la existencia de reactividad cruzada entre Equ c 1 con las lipocalinas de otros roedores. El hecho de que el resto de los pacientes no estuviesen sensibilizados a albúmina probablemente nos indique la ausencia de reactividad cruzada entre lipocalinas del perro, gato o caballo y del hámster Siberiano. A pesar de que la albúmina es una proteína con una alta homología entre las especies de mamíferos, como hemos mencionado anteriormente, existe una notable diferencia en la intensidad de la reactividad IgE lo cual revela la presencia de diferentes epítomos IgE.

Mediante la realización de la PNE (**Tablas 9, Fig. 10**) confirmamos que en 2 pacientes que presentaron síntomas de rinitis con la exposición a hámster Siberiano se produjeron cambios significativos en las mediciones del área transversal mínima (ATM) nasal demostrándose la existencia de una relación causa-efecto directa, lo cual pone de manifiesto la relevancia, en este caso, del pelo del hámster Siberiano como un potente alérgeno capaz de inducir cambios inflamatorios y/o obstructivos en la mucosa nasal. En los trabajos publicados de alergia al hámster Siberiano, no se hace referencia en ningún caso el haberse realizado alguna PNE, por lo que este trabajo es el primero que realiza provocaciones nasales específicas con alérgenos de hámster Siberiano y/u otras especies de hámsteres.

Las PBE (**Tabla 10, Fig 11-14**) realizadas con pelo de hámster Siberiano en ambos pacientes confirmaron la presencia de síntomas de obstrucción bronquial, que junto a los valores de hiperreactividad bronquial e inflamación medido como el aumento significativo de eosinófilos tras la inducción de esputo post-PBE y el FeNO, nos confirmó que dicha fuente alérgica fue capaz de inducir una respuesta clínica obstructiva e inflamatoria importante sugestiva de asma inducido por la exposición al pelo del hámster Siberiano. En el estudio de Bertó y cols.<sup>111</sup> se realizaron 2 PBE con pelo de hámster Siberiano, donde observaron una respuesta asmática temprana en ambos pacientes, sin embargo, no observaron ninguna respuesta asmática tardía, como si sucedió en nuestro trabajo, lo cual nos puso de manifiesto la potencia alérgica del extracto que utilizamos. Varios estudios han demostrado un

aumento de eosinófilos tras una PBE con sustancias de alto peso molecular<sup>152</sup>, aunque también se ha descrito un aumento de neutrófilos en algunos casos<sup>153,154</sup>. El aumento de eosinófilos en el esputo tras una PBE aumenta la especificidad de la prueba<sup>155</sup>.

La medición de la Fracción de Óxido Nítrico exhalado (FeNO) es otro marcador de inflamación bronquial, en este caso no invasivo, que en nuestro estudio se comprobó que produjo una elevación tras la exposición de la paciente a los hámsteres. La medición del FeNO se ha utilizado en la monitorización de las PBE y seguimiento de la clínica de aquellos pacientes que han estado expuestos a agentes de alto peso molecular, como se ha visto en el caso de animales estabulados, donde se han apreciado importantes elevaciones del FeNO<sup>156,157</sup>. Hay muchos estudios que han descrito la asociación entre inflamación eosinofílica de la vía respiratoria y la presencia de NO en el aire exhalado. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la presencia de eosinofilia en esputo siempre supone una anomalía<sup>158</sup> y se ha demostrado que los valores de FeNO aumentan progresivamente en respuesta a la exposición repetida de alérgenos<sup>159</sup>. La medición del FeNO es un buen indicador para predecir la probabilidad de que un asmático responda al tratamiento con corticoesteroides, incluso más que la espirometría, el test broncodilatador, la prueba de hiperrespuesta bronquial con metacolina o la variación del PEF<sup>160</sup>. De igual manera, para saber si persiste o no la exposición al alérgeno responsable de los síntomas.

Mediante el test de exposición a hámster Siberiano (**Tablas 11-21 Fig. 15-28**) nos permitió también demostrar el corto tiempo de latencia en la aparición de síntomas clínicos, como también los cambios citológicos en esputo (presencia de neutrófilos y eosinófilos) que coincidieron con los de la citología nasal, reflejando claramente una importante inflamación bronquial y nasal respectivamente. De igual modo quedaron reflejados hallazgos obstructivos nasales en la RA.

La medición del número de partículas mediante el empleo DustTrak<sup>TM</sup> Aerosol Monitor 8520® dentro de la cámara inhalativa de 7m<sup>3</sup> (**Tabla 15**) nos confirmó la presencia de partículas suspendidas o aerosolizadas en el ambiente, que nos sugirió la procedencia de los 4 hámsteres que se habían colocado dentro de la cámara; dichas partículas fueron captadas al mismo tiempo por el filtro Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota). Este tipo de medición refleja las características aerodinámicas de los alérgenos responsables de los síntomas, ya que estos pueden adherirse a partículas amorfas ambientales pudiendo alcanzar, según su tamaño, el epitelio nasal hasta el epitelio bronquial. Existen diversos estudios que han confirmado estos hallazgos, sobretudo en pacientes que tienen asma dentro de los hogares y poseen mascotas dentro de las mismas<sup>30</sup>. En el caso de los roedores, se ha visto que el tamaño de la partículas del ratón doméstico, cuya morfología es parecida a la de los hámsteres Siberianos, puede oscilar entre 0,4 hasta 0,3µm, pudiendo éstas mantenerse suspendidas hasta una hora según los movimientos de dichos animales<sup>34</sup>. Los hámsteres son roedores de hábitos nocturnos, por ello no es de extrañar que los pacientes pudieran tener síntomas de asma por las noches, sobretudo si tienen las jaulas con los hámsteres colocadas dentro de las habitaciones. El movimiento continuo de estas pequeñas macotas y el pequeño tamaño de las partículas puede favorecer incluso a que se propaguen por todo el hogar. De igual forma, y no menos importante, los alérgenos contenidos en la orina son capaces de aerotransportarse sobre partículas amorfas en el polvo del lecho de los animales<sup>35</sup>, teniendo el mismo potencial sensibilizante que el pelo de estos animales.

El tiempo de mejoría clínica (**Tablas 26-27, Fig. 31**) fue otro dato a reseñar en nuestro estudio, observándose que la mayoría de los pacientes mejoraron clínicamente entre las 4-8 semanas tras haber retirado los hámsteres. Además, comprobamos que existía una relación

inversamente proporcional entre el tiempo de latencia y la mejoría clínica, es decir, a menor tiempo de latencia mayor era el tiempo que tardaban en mejorar los pacientes y viceversa. Este análisis no ha sido descrito en otras series existentes.

Se comprobó la necesidad de recibir medicación (**Fig. 32**) tanto para los síntomas rinoconjuntivales como de asma en la mayoría de los pacientes, a pesar de haberse retirado los hámsteres del domicilio, debido seguramente a la intensidad de los síntomas que tuvieron la mayoría de los pacientes, hasta su completa recuperación semanas después. Del mismo modo, cabe señalar que puede existir riesgo de presentar una anafilaxia por mordedura de hámster Siberiano, tal y como se ha descrito en otros estudios<sup>112,113,115,116</sup>. En varios casos hubo necesidad de atención médica en urgencias con el empleo incluso de adrenalina subcutánea, como ocurrió en uno de los pacientes de nuestro estudio.

En cuanto a las espirometrías realizadas en el momento de la inclusión y posterior revisión a los 6 meses, se observó un incremento del VEF<sub>1</sub> basal y del ratio VEF<sub>1</sub>/FVC en ambos parámetros ( $p < 0,0001$ ), (**Tablas 2 y 22**) lo cual traduce la mejoría clínica experimentada por los pacientes tras el cese de la exposición a los hámsteres en el domicilio. De igual forma, se comprobó una disminución sustancial de la media del valor del FeNO medido a los 6 meses en los pacientes, lo cual reflejó una franca disminución de la inflamación a nivel del tracto respiratorio en estos pacientes (**Tablas 2 y 22**).

## ***5.2. Caracterización de los alérgenos del hámster Siberiano.***

Al no disponer de extractos comerciales diagnósticos para las distintas fuentes alérgicas presentes en las especies de hámsteres incluidas en el estudio, procedimos a la obtención de las mismas como se ha descrito anteriormente. Mediante la cuantificación de proteínas de cada extracto se confirmó la presencia de una importante cantidad de proteínas en las mismas, siendo en todo caso las glándulas salivales, la fuente alérgica con mayor cantidad de proteínas para cada especie de hámster. La saliva en los hámsteres Siberianos es una fuente alérgica importante desde el punto de vista de sensibilización y clínica, ya que, como se ha mencionado anteriormente, han sido descritos varios casos de anafilaxia por mordedura<sup>112,113,115</sup>. De igual forma, la saliva en otros mamíferos domésticos, como el perro y el gato, ha sido considerada una fuente común e importante de alérgenos<sup>161</sup>. También en el caso de la rata<sup>162</sup> y el conejo<sup>163</sup> la saliva ha sido descrita como fuente alérgica importante en varios estudios.

El análisis inicial de cada uno de los extractos alérgicos mediante la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) (**Fig 35-37**) reveló la existencia de numerosas bandas en el rango de 18 hasta 67 kDa, destacando 3 de ellas por su intensidad, con pesos aproximados de 18, 21 y 23 kDa, y otra banda, también relevante, de 66-67 kDa de peso, la cual corresponde al peso descrito para las albúminas, como se ha comprobado en diversos estudios realizados con mamíferos<sup>144,145</sup>.

En los estudios de inmunodetección (Western blot) (**Fig 39-40**) con pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano comprobamos la capacidad de unión de las IgE séricas de los pacientes frente a los extractos de pelo, saliva y orina de hámster Siberiano y en el caso del hámster Roborowski, también hubo una unión IgE-específica frente a los distintos extractos. Esto nos haría pensar la posibilidad de una probable reactividad cruzada entre ambas especies. En el caso de los ensayos de inmunodetección con las fuentes alérgicas de hámster común o Europeo y el hámster dorado se constató la ausencia de fijación de los



sueros a dichas bandas presentes en el SDS-PAGE, lo cual podría descartar la reactividad cruzada entre el hámster Siberiano y estas especies de hámster. En el estudio presentado por Cedena JR y cols<sup>119</sup> se hace mención a la reactividad cruzada existente entre el hámster común o Europeo (*Cricetus cricetus*) y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), ambos de géneros taxonómicamente más próximos entre sí y más distantes del género al que pertenecen los hámsteres “pequeños” como es el género *Phodopus* en el que encontramos la especie de hámster Siberiano, ruso o de Dzungaria y el hámster Roborowski.

Las bandas de 18, 21 y 23 kDa reconocidas por el pool de sueros de pacientes alérgicos a hámster Siberiano ya habían sido identificadas en estudios previos<sup>110,111,118</sup>. Estos pesos moleculares corresponden al descrito para las lipocalinas<sup>164</sup>. La reactividad cruzada entre lipocalinas puede ser asimétrica en el caso de alérgenos que contienen tanto determinantes IgE únicos como comunes<sup>165</sup>. Esto es probablemente lo que ocurre en el caso entre Mus m 1 y Equ c 1 y también entre Can f 1 y Can f 2, porque la reactividad cruzada no es recíproca entre ambas parejas de alérgenos<sup>151</sup>. Aunque la presencia de epítomos comunes y únicos podría explicar este fenómeno, otra explicación sería la de la presencia de una proteína dimerica que tiene el potencial alergénico mayor que la de una monomérica, porque la dimerización puede crear nuevos epítomos adicionales<sup>166</sup>.

Los ensayos de inhibición realizados con las tres fuentes alergénicas estudiadas en el hámster Siberiano, utilizando en cada caso las mismas tres fuentes alergénicas respectivamente revelaron que los alérgenos del hámster Siberiano presentes en cada fuente son idénticos desde el punto de vista inmunológico y molecular. (**Fig 41**). Cuando se compararon mediante ensayos de inhibición con los alérgenos de otras especies presentes en el pelo de jerbo (*Meriones unguiculatus*), ratón (*Mus musculus*) y conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (**Fig. 42**) se observó una ausencia de inhibición, por lo tanto descartándose así la reactividad cruzada entre ellos.

Al realizarse el ensayo de inhibición comparando el extracto de glándulas salivales del hámster Siberiano frente a los extractos de glándulas salivales del resto de especies de hámsteres incluidas, se observó una inhibición moderada en el caso del hámster Roborowski, mientras que no hubo inhibición frente al hámster común o Europeo y el hámster dorado, lo cual nos reveló que estas últimas dos especies no tienen reactividad cruzada con el hámster Siberiano (**Fig 43**).

A la luz de los resultados obtenidos de la secuenciación del N-terminal de las 3 bandas fijadoras de IgE reveladas en los ensayos de inmunodetección se comprobó que las secuencias fueron idénticas en las 3 bandas analizadas de las 3 fuentes estudiadas. Estos datos nos confirmaron que las bandas fijadoras de IgE correspondieron a una misma proteína o sus isoformas, encontrándose una secuencia de aminoácidos que poseía gran homología con las denominadas proteínas de unión a odoríferos (odorant-binding protein), pertenecientes a la superfamilia de las lipocalinas, y a las proteínas similares a la afrodisina (aphrodisin-like proteins). Tras realizar un estudio mediante técnicas proteómicas, se llegó a caracterizar de forma parcial los 14 residuos aminoácidos de la secuencia amino-terminal de dicha banda proteica, la cual fue la siguiente: SPFDPKELEGEWHTLR. Tras realizarse la clonación, expresión y purificación se obtuvo una proteína que describimos como rPho s 21 kDa la cual presentaba el “motivo” de secuencia típico de las lipocalinas GXW en las posiciones 8-10.

La búsqueda en las bases de datos del programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostró que había una homología significativa entre los péptidos de proteínas de la “odorant-

binding protein” de la especie *Myodes glareolus* (topillo rojo) que es una especie de roedor miomorfo de la familia Cricetidae y con la afrodisina de la especie *Cricetus cricetus* (hámster común o Europeo) (**Tabla 30**). Dentro de los estudios realizados con hámsteres Turton y cols.<sup>97</sup> trabajando con el hámster Roborowski (*Phodopus roborowskii*) encontraron 2 proteínas de 6 y 17 kDa respectivamente cuyo análisis por espectrometría de masas reveló que la proteína de 6 kDa no era un fragmento de la proteína de 17 kDa y que ninguna de las proteínas era un fragmento de una proteína conservada más grande como la seroalbúmina. Se determinó la masa de la proteína más grande como invariante, a  $17144 \pm 2$  Da en todas las muestras. Esta proteína fue denominada “Roborovskina”. En nuestro estudio no hemos realizado comparaciones de proteínas a nivel molecular con los sueros de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano, pero sería interesante una vez demostrado que existe una reactividad cruzada parcial entre el hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y el hámster Roborowski (*Phodopus roborowskii*) poder realizar ensayos “in vitro” comparando ambas proteínas.

Tras los ensayos de expresión y purificación de la proteína recombinante del hámster Siberiano que se obtuvo mediante clonación (**Fig. 46-48**), se observó en el ensayo de inmunodetección (Western blot) que el pool de sueros reconoció una banda de 21 kDa, que es similar a las bandas que habían sido identificadas y reconocidas por los pacientes frente a cada uno de los extractos nativos (pelo, glándulas salivales y orina) del hámster Siberiano (**Fig. 49**).

Del mismo modo, los ensayos de inmunodetección realizados con la proteína recombinante de hámster Siberiano frente a cada suero de forma individual reveló el reconocimiento de esta proteína por todos los pacientes incluidos, lo cual habla de la homología molecular entre el extracto nativo y el recombinante. Este dato es realmente importante, ya que, desde el punto de vista práctico, se traduce en la utilidad de esta proteína recombinante como herramienta diagnóstica “in vitro”. A su vez, observamos que, en nuestro caso, un 42% de los pacientes reconocieron una banda de 66-67 kDa, correspondiente al peso molecular descrito para las albúminas, que como hemos mencionado anteriormente, hasta un 30% de los pacientes alérgicos a animales domésticos (mamíferos) reconocen esta proteína<sup>102</sup>, la cual a su vez es responsable de la reactividad cruzada entre animales mamíferos<sup>99</sup> (**Fig. 50-51**).

El ensayo de inmunodetección (Western blot) realizado con el suero de la paciente a la que se sometió al test de exposición reveló una fijación de bandas 18, 21 y 23 kDa, tanto en el extracto de pelo, glándulas salivales y orina, como también en el extracto de la membrana de politetrafluoretileno colocada sobre el filtro automático de partículas de tipo Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota) que habían sido previamente identificadas mediante SDS-PAGE (**Fig. 52-53**). La inmunodetección de dichas bandas presentes en el filtro nos confirmó que estos alérgenos tienen la capacidad de volatilizarse o ser aerotransportados teniendo de esta forma la capacidad de inducir la sensibilización y posterior clínica en los pacientes expuestos a hámster Siberiano dentro de sus hogares. Este hallazgo es comparable al estudio de De las Heras *et al* que describieron un caso de asma ocupacional en una bióloga que manipulaba y se exponía a jerbos (*Meriones unguiculatus*) en su ámbito laboral y donde demostraron la presencia de una banda fijadora de IgE de 23 kDa en el suero de la paciente, y en la inmunodetección en el extracto de la membrana del Air Sentinel (Quan-Tec-Air, Rochester, Minnesota)<sup>61</sup>. Sin embargo, no hay ninguna referencia de Test de exposición realizados con otros hámsteres y/u otros roedores utilizados como mascotas dentro de los domicilios.

El ensayo de inhibición realizado con la proteína recombinante de hámster Siberiano frente a los extractos de glándulas salivales de las especies de hámsteres incluidas reveló una moderada inhibición en el caso del extracto de glándulas salivales de hámster Roborowski, lo cual se traduce en una probable reactividad cruzada entre hámster Siberiano y esta especie; sin embargo, la ausencia de inhibición frente a hámster común y dorado descarta por completo la reactividad cruzada frente a hámster Siberiano (**Fig. 54**).

El ensayo de inhibición realizado en paralelo con los sueros pre-incubados con extracto nativo de glándulas salivales de hámster Siberiano y con el extracto de proteína recombinante (*rPho s 21 kDa*) frente a los mismos extractos en fase sólida (**Fig. 55**) confirmó la inhibición completa del extracto nativo de hámster Siberiano frente a la a proteína recombinante, mientras que el hámster Roborowskii mostraba una inhibición parcial tanto para el extracto nativo de glándulas salivales como de la proteína recombinante de hámster Siberiano, por lo tanto podemos afirmar la existencia de una reactividad cruzada parcial entre ambas especies de hámsteres.

El ensayo ELISA realizado (**Fig. 56**) con la proteína recombinante (*rPho s 21 kDa*) y el extracto de glándulas salivales de hámster Siberiano demostró una alta correlación entre los niveles de IgE específica de ambos extractos. A partir de estos resultados, podemos afirmar que la proteína recombinante obtenida (*rPho s 21 kDa*) y el extracto nativo de glándulas salivales de hámster Siberiano tiene la misma capacidad de fijación a IgE, por lo que tal como demostramos en los ensayos de inmunodetección por Western blot, la proteína recombinante del hámster Siberiano puede ser de utilidad diagnóstica en ensayos “*in vitro*”.

De igual forma, quedó demostrado mediante ensayo de ELISA inhibición (**Fig. 57**) la ausencia de inhibición, y por tanto, de reactividad cruzada, entre el hámster Siberiano y el hámster común o Europeo y el hámster dorado, mientras que con el hámster Roborowski se obtuvo una inhibición parcial de hasta un 64%, pudiéndose afirmar la probable reactividad cruzada entre el hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y el hámster Roborowski (*Phodopus roborowskii*), y que esta reactividad cruzada podría ser explicada por la proximidad filogenética entre estas especies pertenecientes al género *Phodopus*, también conocido como el de los “hámsteres de cola corta”.

Finalmente mediante el test de activación de basófilos (**Fig. 58-59**) quedó patente la actividad biológica tanto de la proteína del extracto nativo de glándulas salivales como de la proteína recombinante (*rPho s 21 kDa*) obtenida a partir de glándulas salivales del hámster Siberiano, confirmándose que la sensibilización a ambas es capaz de inducir la degranulación de basófilos, y por consiguiente, la expresión clínica sintomática.

El alérgeno principal de hámster Siberiano fue clonado por primera vez y sus propiedades alérgicas fueron caracterizadas, sirviéndonos de gran utilidad para nuestra práctica médica diaria, ya que nos permitirá realizar el diagnóstico específico de la alergia al hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*) y así mismo, nos servirá para discriminar el diagnóstico frente a otras especies de hámsteres a los que pudieran haber estado expuesto nuestros pacientes.

# ***CONCLUSIONES***



## CONCLUSIONES

A partir de los objetivos de nuestro estudio y analizando los resultados obtenidos podemos concluir que:

- 1.- La alergia al hámster Siberiano es una patología de gente joven. La mayoría de los pacientes desarrollaron rinoconjuntivitis y asma. Existe el riesgo de anafilaxia en caso de mordedura. Las tres fuentes alérgicas estudiadas tienen la misma capacidad de sensibilizar a los pacientes, de aerosolizarse y de inducir cambios obstructivos e inflamatorios a nivel del epitelio nasal y bronquial.
- 2.- Se identificaron y reconocieron tres bandas fijadoras de IgE de 18, 21 y 23 kDa respectivamente, presentes en las tres fuentes alérgicas.
- 3.- Existe una reactividad cruzada parcial entre las especies de hámster Siberiano y hámster Roborowski; sin embargo, no existe frente a las especies de hámster común o Europeo y hámster dorado, y tampoco frente a otras especies de roedores estudiados.
- 4.- Se demostró que las bandas de 18, 21 y 23 kDa presentaron la misma secuencia de péptidos internos, sugiriendo que la banda de 21 kDa es una única proteína y las otras dos bandas son isoformas resultantes de la degradación interna. Esta proteína corresponde a una “odorant-binding protein” que pertenece a la superfamilia de las lipocalinas y fue reconocida por los sueros de los pacientes.
- 5.- Se realizó la clonación de la proteína del hámster Siberiano que hemos descrito por primera vez, como ***rPho s 21 kDa***, la cual presentó un patrón de fijación IgE y una actividad biológica similar al extracto nativo de glándula salivales, permitiendo utilizarla como una herramienta útil en el diagnóstico específico de los pacientes alérgicos a hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).



# ***BIBLIOGRAFÍA***





## BIBLIOGRAFÍA

1. Alergológica 2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Fundación SEAIC. Schering Plough. 2005.
2. Alergológica 1992. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 1992. Fundación SEAIC. Schering Plough. 1992.
3. Igea Aznar, JM; Pérez Santos, C. Novedades en Alergia Siglo XXI. Ediciones Médicas y Publicidad. SEAIC.
4. Abraham CM, Ownby DR, Peterson EL, *et al.* The relationship between seroatopy and symptoms of either allergic rhinitis or asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119:1099-1104, 2007.
5. Phillips JF, Lockey R. Exotic pet allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 513-5.
6. Jeal H., Jones M. Allergy to rodents: an update. *Clinical et experimental Allergy*, 40, 1593-1601, 2010.
7. T Niitsuma, A Tsuji, M Nukaga, A Izawa, M Okita, N Marouka, A Oguchi, S Morita, Y Matsusumura, M Tsuyuguchi, T Hayashi. Thirty cases of bronchial asthma associated with exposure to pet hamsters. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2004; Vol. 14(3): 221-224.
8. Phipatanakul W, Eggleston PA. Mouse allergen II: The relationship of mouse allergen exposure to mouse sensitization and asthma morbidity in inner-city children with asthma. The National Cooperative Inner-City Asthma Study. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:1075-1080.
9. Wegienka G, Cole Johnson C, Havstad S, Owny D. Indoor pet exposure and the outcomes of total IgE and sensitization at age 18years. *J Allergy Clin Immunol* (2010) vol 126, 2: 274-80.
10. Peat JK, Li J. Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1-10.
11. Zubeldia JM, Baeza ML, Jáuregui I, Senent C, El Libro de las Enfermedades Alérgicas. Fundación BBVA. Fundación SEAIC.
12. Rylander R. Endotoxin and occupational airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6:62-66.
13. Renström A, Olsson M, Hedrén M, Johansson SGO, van Hage M. Pet shop workers: exposure, sensitization, and work-related symptoms. *Allergy* (2011) 66: 1081-1087.
14. Baur X, Dewair M, Furhman G, Ashauer H, Pfletschinger J, Braunitzer G. Hypersensitivity to chironomids (non-biting midges): localization of the antigenic determinants within certain polypeptide sequences of hemoglobulins of *Chironomus thumini thumini* (dipteral). *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 60-76.
15. Bernstein DI, Gallagher JS, Bernstein IL. Mealworm asthma: clinical and immunology studies. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:475-480.

16. Freye HB, Esch RE, Litwin CM, Sorkin L. Anaphylaxis to the ingestion and inhalation of *Tenebrio molitor* (mealworm) and *Zohobas morio* (superworm). *Allergy Asthma Proc* 1996; 17:215-219.
17. Kelso JM, Fox RW, Jones RT, Yunginger JW. Allergy to iguana. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:369-372.
18. Calvert JE, Baldwin CI, Allen A, Todd A, Bourke SJ. Pigeon fanciers lung a complex disease? *Clin Exp Allergy* 1999; 29:166-175.
19. Esmeralda JM, Gert D, Martin JS, Rob CA, Jaring S. Spreading of occupational allergens: laboratory animal allergens on hair-covering caps and in mattress dust of laboratory animal workers. *Occup Environ Med*. 2007; 64:267-272.
20. Krakowiak A, Szulc B, Górski P. Allergy to laboratory animals in children of parents occupationally exposed to mice, rats and hamsters. *Eur Respir J* 1999; 14: 352-356.
21. Shumacher MJ. Characterization of allergens from urine and pelts of laboratory mice. *Mol Immunol* 1980; 17:1087-1096.
22. Vandoren G, Mertens B, Heyns W, van Baelen H, Rombauts W, Verhoven G. Different forms of  $\alpha_{2u}$ -globulin in male and female rat urine. *Eur J Biochem* 1983; 134: 175-181.
23. Sagakuchi M, Inouye S, Miyazawa H, Kamimura M, Yamazaki S. Evaluation of countermeasures for reduction of mouse airborne allergens. *Lab Anim Sci* 1990; 40:613-615.
24. Tiikkainen U, Klockars M. Clinical significance of IgG subclass antibodies to wheat flour antigens in bakers. *Allergy* 1990; 45: 497-504.
25. Krakowiak A, Wiszniewska M, Krawczyk P, Szulc B, Wittczak T, Walusiak J, Palczynski C. Risk factors associated with airway allergic diseases from exposure to laboratory animal allergens among veterinarians. *Int Arch Occup Environ Health* 2007. 80:465-475.
26. Nienhaus A, Skudlik C, Seidler A. Work-related accidents and occupational diseases in veterinarians and their staff. *Int Arch Occup Environ Health* 2005. 78: 230-238.
27. van Ree Ronald. Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. *J Allergy Clin Immunol*. Vol 119, number 2: 270-77.
28. Phipatanakul W, Eggleston PA, Wright EC, Wood RA: Mouse Allergen. The prevalence of mouse allergen in inner-city homes. The National Cooperative Inner-city Asthma study. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 106:1070-1074.
29. Phipatanakul W. Animal allergens and their control. *Current Allergy Reports* 2001, 1:461-465.
30. Wood RA, Chapman MD, Adkinson NF Jr., Eggleston PA. The effect of cat removal in household dust samples. *J Allergy Clin Immunol* 1989, 83:70-74.
31. Bollinger ME, Eggleston PA, Wood RA. Cat antigen in homes with and without cats may induce allergic symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 97:907-914.

32. Almqvist C, Larsson PH, Egmar AC, *et al.* School as a risk environment of children allergic to cats and site for transfer of cat allergen to homes. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:1012-1017.
33. Custovic A, Green A, Fletcher A, *et al.* Aerodynamic properties of the major dog allergen, Can f 1; distribution in homes concentration, and particles size of allergen in air. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:94-98.
34. Bush RK, Wood Ra, Egglestone PA. Laboratory animal allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 99-112.
35. Ohman JL Hagberg K. Distribution of airborne mouse allergen in a major mouse breeding facility. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 810-817.
36. Custovic A. Murray CS. Controlling indoor allergens. *Am Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 432-442.
37. Erwin EA, Woodfolk J. Animal danders *Immunol Allergy Clin N Am.* 2003; 23: 469-481.
38. Swanson M, Agarwal M, Yunginger J, Reed C. Guinea pig derived allergens. Clinicoimmunologic studies, characterization, airborne quantitation and size distribution. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 844-849.
39. Cohn RD, Arbes SJ Jr, Yin M, Jaramillo R, Zeldin DC. National prevalence and exposure risk for mouse allergen in US house-holds. *J Allerg Clin Immnuol* 2004; 113:1167-71.
40. Cockcroft A. Edwards J, McCarth P, Andersson N. Allergy in laboratory animal workers. *Lancet* 1981; 827-30.
41. Jeal H, Draper A, Jones M *et al.* HLA associations with occupational sensitization to rat lipocalin allergens: a model for other animal allergies? *J Allerg Clin Immunol* 2003; 111: 795-9.
42. Jeal H, Draper A, Harris J, Taylor AN, Cullinan P, Jones M. Modified TH<sub>2</sub> responses at high-dose exposures to allergen using an occupational model. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:21-5.
43. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitization, asthma, and a modified TH<sub>2</sub> response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; 357:752-6.
44. Matsui EC, Wood RA, Rand C, Kanchanaraksa S, Swartz L, Eggleston PA. Mouse allergen exposure and mouse skin test sensitivity in suburban, middle-class children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 910-5.
45. Platts-Mills TA, Satinover SM, Nacara L *et al.* Prevalence and titer of IgE antibodies to mouse allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1058-64.
46. Jeal H, Jones M. Allergy to rodents. *Clinical and Experimental Allergy*, 2010; 40, 1593-160.

47. Phipatanakul W, Eggleston PA, Wright EC, Wood RA. Mouse allergen: II. The relationship of mouse allergen exposure and mouse skin test sensitivity in suburban, middle-class children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:1075-80.
48. Phipatanakul W, Celedon JC, Sredl DL, Weiss ST, Gold DR. Mouse exposure and wheeze in the first year of life. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94:593-9.
49. Matsui EC, Simons E, Rand C *et al.* Airborne mouse allergen in the homes of inner-city children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:358-63.
50. Krakowiak A, Szule B, Gorski P. Allergy to laboratory animals in children of parents occupationally exposed to mice, rats and hamsters. *Eur Respir J* 1999; 14:352-6.
51. Chew GL, Correa JC, Perzanowski MS. Mouse and cockroach allergens in the dust and air northeastern United States inner-city public high schools. *Indoor Air* 2005; 15:228-34.
52. Phipatanakul W, Celedon JC, Hoffman EB, Abdulkerim H, Ryan LM, Gold DR. Mouse allergen exposure, wheeze and atopy in the first seven years of life. *Allergy* 2008; 63:1512-8.
53. Sheehan WJ, Rangsithienchai PA, Muilenberg ML *et al.* Mouse allergen in urban elementary schools. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; 102:125-30.
54. Phipatanakul W. Rodent Allergens. *Current Allergy and Asthma reports* 2002; 2: 412-416.
55. Price JA, Longbottom J. Allergy to mice. Further characterization of two major mouse allergens (Ag 1 and Ag 3) and immunohistochemical investigations of their sources.
56. Siraganian R, Sandberg A: Characterization of mouse allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1979, 63: 435-442.
57. Bayard C, Holmquist L, Vesterburg O: Purification and identification of allergenic alpha (2u) globulin species of rat urine. *Biochem Biophys Acta* 1996. 1290:129-134.
58. Gordon S, Tee RD, Atuart MC, Newman Taylor AJ. Analysis of allergen in rat fur and saliva. *Allergy* 2001, 56:563-756.
59. Swanson M, Argawal M, Yunginger J, Reed C. Guinea pig derived allergens, Clinicoimmunologic studies, characterization, airborne quantitation and size distribution. *Am Rev Respir Dis* 1984, 129: 844-849.
60. Warner JA, Longbottom J. Allergy to rabbits. *Allergy* 1991, 46:481-491.
61. De las Heras M, Cuesta-Herranz J, Cases B, de Miguel J, Fernández-Nieto M, Sastre J, Vivanco F, Pastor-Vargas C. Occupational asthma caused by gerbil: purification and partial characterization of a new gerbil allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010 Jun; 104(6):540-2.
62. Gonzalez de Olano D, Bartolome B, Cases Ortega B, Pérez-Gordo M, Vivanco F, Pastor Vargas C. Allergy to prairie dog lipocalins. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2010.104: 97.

63. Virtanen T, Zeiler T. Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic? *Int. Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 247-258.
64. Pervaiz S, Brew K. Homology and structure function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J* 1987; 1: 209-214.
65. Flower DR: The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318: 1-14.
66. Flower DR, North AC, Attwood TK: Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci.* 1993; 2:753-761.
67. Bartsch S, Tschesche H, 1995. *FEBS Lett.* 357: 255-259.
68. Finlayson JS, Potter M, Rummer RC. 1963. *J Nat Cancer Inst.* 31: 91-97.
69. Shaw PH, Held WA, Hastle MD. 1983. *Mol Cell* 32, 755-761.
70. Henzel WJ, Rodríguez H, Singer AG, Stilts JT, Macrides F, Agosta WC, Nial H. 1998. *J Biol Chem* 263, 16682-16687.
71. Magert HJ, Hadys T, Cieslak A, Groger A., Feller S, Forsmann WG. 1995. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92, 2091-2095.
72. Singer AG, Macrides F, Clancy AN, Agosta WC. 1986. *J. Biol Chem.* 261, 13322-13326.
73. Snyder SH, Sklar PB, Pevsner J. 1998. *J Biol Chem.* 263, 13971-13974.
74. Miyawaki A, Matsushita F, Ryo Y, Mikoshiba K. 1995. *EMBO J.* 13, 5835-5842.
75. Schmale H, Holtgreve-Grez H, Christiansen H. 1990. *Naute.* 343, 366-369.
76. Urade Y, Nagata A, Suzuki Y, Fujii Y, Hayaishi O. *J Biol Chem.* 1989. 264, 1041-1045.
77. Chapman MD, Ichikawa K, Vailes LD. Molecular cloning of a new cat allergen, cystain, a cysteine protease inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:S 122.
78. Bush RK, Wood RA, Eggleston PA. Laboratory animal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 99-112.
79. Newman Taylor A, Longbottom JL, Pepys J. Respiratory allergy to urine proteins of rats and mice. *Lancet* 1997; ii: 847-849.
80. Siraganian RP, Sandberg AL. Characterization of mouse allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63: 435-442.
81. Longbottom JL, Price JA. Allergy to laboratory animals. Characterization and source of two major mouse allergens, Ag 1 and Ag3. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82:450-452.
82. Finlayson JS, Asofsky R, Potter M, Runner CC. Major urinary protein complex normal mice. *Origin. Science* 1965; 149: 981-982.

83. Longbottom JL. Purification and characterization of allergens from the urines of mice and rats. *Adv Allergol Appl Immunol*. Oxford, Pergamon Press. 1980, pp 483-490.
84. Prahl P, Plesner T, Weeke B, Lowenstein H, Isolation and partial characterization of three major allergens in an extract from cow hair and dander. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982; 67:293-301.
85. Parkinen S, Rytönen M, Pentikäinen J, Virtanen T, Mäntylä R. Homology of a bovine allergen and the oligomycin sensitivity-confering protein of the mitochondrial adenosine triphosphate synthase complex. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1255-1260.
86. Rautanen J, Rytönen M, Virtanen T, Pentikäinen J, Zeiler T, Mäntylä R. BDA20, a major bovine dander allergen characterization at the sequence level, in Bos d 2. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:251-252.
87. Ylönen J, Mäntylä R, Taivainen A, Virtanen T: IgG and IgE antibody responses to cow dander and urine in farmers with cow-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:83-90.
88. de Groot H, Goei KG, van Swieten P, Aalberse RC. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract. Serologic activity of affinity-purified Can f 1, and of Can f 1-depleted extract. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:1056-1065.
89. Blands J, Lowenstein H, Weeke B. Characterization of extract of dog hair and dandruff from six different dog breeds by quantitative immunoelectrophoresis. Identification of allergens by crossed radioimmunoelectrophoresis. *Acta Allergol* 1997; 32: 125-133.
90. Uhlin T, Reuterby J, Einarson R. Antigenic/allergenic composition of Poodle/Alsarian dandruff extract. *Allergy* 1984; 39: 125-133.
91. Ford AW, Alterman L, Kemeny DM. The allergens of dog. Identification using crossed radio-immunoelectrophoresis. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:183-190.
92. Schou C, Hansen GN, Litner T, Lowenstein H. Assay for the major dog allergen, Can f 1: Investigation of house dust samples and commercial dog extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 847-853.
93. Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF, Aalberse RC, Wallner BP, Kassian MT. The major dog allergen, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins. Cloning and Immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology* 1997, 92: 577-586.
94. Lowenstein H, Markussen B, Weeke B. Isolation and partial characterization of three major allergens of horse hair and dandruff. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 51: 48-67.
95. Schou C. Defining allergens of mammalian origin. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:7-14.
96. Sarpong SB, Hamilton RG, Eggleston PA, Adkinson NF, Jr. Socioeconomic status and race as risk factors for cockroach allergen exposure and sensitization in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1393-1401.

97. Turton M, Robertson D, Smith J, Hurst J and Beynon R. Roboroskin a Lipocalin in the Urine of the Roborowski hamster, *Phodopus roborovskii*. Chem Senses 2010. 35: 675-684.
98. Spitzauer S. Allergy to mammalian proteins: at the borderline between foreign and self? Int Arch Allergy Immunol 1999; 120:259-269.
99. Spitzauer S, Pantjaitan B, Söregi G, Mühl S, Ebner C, Kraft D, Valenta R, Rumpold H. IgE cross-reactivities against albumins in patients allergic to animals. J Allergy Clin Immunol. 1995. 96:6, 951-958.
100. Spitzauer S, Schweiger C. Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen. J Allergy Clin Immunol 1994; 93:614-627.
101. Vanto T, Viander M, Schwartz B. Dog serum albumin as an allergen. Int Arch Allergy Appl Immunol 1982; 69:311-5.
102. Schou C. Defining allergens of mammalian origin. Clin Exp Allergy 1993; 23:7-14.
103. Morgenstern JP, Griffith IJ, Brauer AW, Rogers BL, Bond JF, Chapman MD, Kuo MC, Amino acid sequence of *Fel d 1*, the major allergen of the domestic cat: Protein sequence analysis and cDNA cloning, Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88:9690-4.
104. <http://es.wikipedia.org/wiki/Cricetinae>
105. Hook WA, Powers K and Siraganian RP. Skin tests and blood leukocyte histamine release of patients with allergies to laboratory animals. J Allergy Clin Immunol 73: 457-465.
106. Armentia A, Moneo I, Cuevas A y cols. (1986). Diagnóstico de asma bronquial por sensibilización a epitelio de hámster mediante técnica de liberación de histamina. Rev Esp Alergol Inmunol Clin 1:201-204.
107. Armentia A, Quintero A, Fernández A (1989). Sensibilización a antígenos: estudio preliminar. Rev Esp Alergol Inmunol Clin 4: 9-16.
108. Castillo R, Martínez-Alzamora A y cols (1990): Asma por hámster: estudio de 33 casos. Rev Esp Alergol Inmunol Clon vol 5 suppl 3: abstract 15.
109. Caravaca F, Zapatero L y Montero M (1990). Asma bronquial por sensibilización a hámster. Rev Esp Alergol Inmunol Clon vol 5, 4:53-55.
110. Ornia N, Ojeda I, Noche CD et al (1994). hamster sensitization in Madrid area. Allergy and Clinical Immunology News. Abstract 1761. June 26-July 1. Stockolm, Sweeden.
111. Bertó JM, Peláez A, Fernández E, Lombardero M, Ferrer M. Siberian hamster: a new indoor source of allergic sensitization and respiratory disease. Allergy 2002; 57: 155-159.
112. Tomitaka A, Suzuki K, Akamatsu H, Matsunaga K. Anaphylaxis after hamster bites: a rare case?. Contact Dermatitis 2002.46: 113.
113. Niitsuma T, Tsuji A, Nukaga M, Izawa A, Okita M, Marouoka N, Morita S, Tsuyuguchi M. Two cases of anaphylaxis after dwarf hamster bites. Allergy net. Allergy 2003.58: 1081.



114. Niitsuma T, Tsuji A, Nukaga M, Izawa A, Okita M, Maruoka N, Oguchi A, Morita S, Matsumara Y, Tsuyuguchio M, Hayashi T. Thirty cases of bronchial asthma associated with exposure to pet hamsters. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2004; vol 14(3): 221-224.
115. Lim DL, Chan RM, Wen H, van Bever HPS, Chua KY. Anaphylaxis after hamster bites. Identification of a novel allergen. *Clin Exp Allergy* 2004. 34: 1122-1123.
116. González-Mendiola R, Prieto Montaña P, Hinojosa Macías M, Lombardero M, Muñoz Martín T. Allergic rhinoconjunctivitis and asthma due to sensitization to Siberian hamster. *Allergy net, Allergy* 2004; 59: 1015-1016.
117. Cisteró-Bahíma A, Enrique E, San Miguel-Moncín M, Alonso R, Bartrá J, Fernández-Parra B, Lombardero M, Barber D. *Allergy* 2003; 58: 161-162.
118. Torres JA, Pastor-Vargas C, de las Heras M, Vivanco F, Cuesta J, Sastre J. An odorant-binding protein as a new allergen from Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157: 109-112.
119. Leonor Cedena JR, Iraola Calvo V, Gallego Cámara MT, Carnés Sánchez J. Reactividad cruzada entre el hámster europeo (*Cricetus cricetus*) y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2012 Vol. 22 Supplement 1. Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC Pamplona 2012).
120. Recher K, Montserrat Gili JR, Gras Cabrerizo JR, Morán Guash J, Vergés Bueno J. Exploración Clínica, Funcional y de imagen de las fosas nasales y senos paranasales. Manual del Residente de ORL y Patología Cerviño-Facial. IM&C, SA. 2002.
121. Delgado J, Quirce S. Pruebas de función pulmonar e inflamación bronquial. p. 211-219. 2012. Glaxo SmithKline.
122. Delgado J, Quirce S. Pruebas de función pulmonar e inflamación bronquial. p. 25-32. 2012. Glaxo SmithKline.
123. Niemeijer NR, Goedewaagen B, Kauffman HF, de Monchy JG. Optimization of skin testing. I. Choosing allergen concentrations and cut-off values by factorial design. *Allergy* 1993; 48(7): 491-497.
124. Quirce S, Fernandez-Nieto m, Escudero C, Cuesta J, de las Heras M, Sastre J. Bronchial responsiveness to bakery-derived allergens is strongly dependent on specific skin sensitivity. *Allergy* 2006. Oct; 61(10): 1202-8.
125. In vitro diagnostic evaluation of patients with inhalant allergies: summary of probability outcomes comparing results of CLA- and CAP-specific immunoglobulin E test systems. *Allergy Asthma Proc.* 2003 Jul-Aug; 24(4): 253-8.
126. Gosepath J, Amadee RG, Mann WJ. Nasal Provocation testing as an international Standard for Evaluation of allergic and nonallergic Rhinitis. *Laryngoscope* 2005; 115 (3): 512-516.

127. Hilberg O, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: recommendations for technical specifications and Standard operating procedures. *Rhinology* 2000; 16 (Suppl): 3-18.
128. Chan-Yeung M, Kinsella M, Ostrow D.N. Specific broncoprovocation testing. *Clin Rev Allergy* 1990; 92:193-198.
129. Pin I, Freitag AP, O'byrne P et al. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic response. *Am. Rev. Dis* 1992; 145: 1265-9.
130. Tockman MS, Qiao Y, Li L et al. Safe preparation of sputum cells from mucoid glycoprotein. *Acta Cytologica*.1995; 39: 1128-36.
131. Abuaf N., Rajoely B., Gaouar H., Pecquet C., Leynadier F. Flow cytometry in the diagnosis of allergy. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, Vol 44, No.1, January 2004, pp.37
132. Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJA, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: A method and clinical survey. *Clin allergy* 1977; 235-243.
133. Delgado J, Quirce S. Pruebas de función pulmonar e inflamación bronquial. p. 55-67. 2012. Glaxo SmithKline.
134. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG et al. Guidelines for metacholine and exercise challenge testing. *Am J Respir Crit Med*. 2000; 161: 309-29.
135. Cartier A, Malo JL. Occupational challenge tests. En: *Asthma in the workplace*. Second edition. New York. Marcel Dekker, 199; 226.
136. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
137. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
138. Towbin H. Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979
139. Shevchenko A, Sunyaev S, Liska A, Bork P. Nanoelectrospray tandem mass spectrometry and sequence similarity searching for identification of proteins from organisms with unknown genomes. *Methods Mol Biol*. 2003; 211:221-34.
140. Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS. *Anal Chem*. 2002 Aug 1; 74(15): 3915-23.
141. Platts-Mills T.A.E. Indoor allergens. En: *Middleton's Allergy & Practice*. Mosby INC. Sixth edition. Philadelphia. 2003 pp 557-572.
142. Bush RK. Wood RA. Laboratory animal allergy. *J. Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 99-112.

143. Desjardins A, Benoit C, Ghezze H, L'Archeveque J, Leblanc C, Paquette L, Cartier A. Exposure to domestic animals and risk of immunologic sensitization in subjects with Asthma. *J. Allergy Clin Immunol* 1993 May; 91(5): 979-86.
144. Agrup G, Sjösted C. Contact urticarial in laboratory technicians working with animals. *Acta Derm Venereol* 1985; 65 (2): 111-5.
145. Seward PJ. Occupational allergy to animals. *Seward PJ. Occup Med* 1999. Apr-Jun; 14 (2): 285-304.
146. Schou C. Defining allergens of mammalian origin. *Clin Exp Allergy* 1999; 23:7-14.
147. Díaz-Perales A, González de Olano D, Pérez-Gordo M, Pastor-Vargas C. Allergy to uncommon pets: new allergies but the same allergens. *Frontiers in Immunology*. December 2013. Vol 4. Article 492. pp 1-6.
148. Kaiser L, Grönlund H, Sandalova T, Ljunggren HG, van Hage-Hamsten M, Achour A, Schneider G (September 2003). "The crystal structure of the major cat allergen Fel d 1, a member of the secretoglobulin family". *J. Biol. Chem.* 278 (39).
149. A Konieczny, J P Morgenstern, C B Bizinkauskas, C H Lilley, A W Brauer, J F Bond, R C Aalberse, B P Wallner, and M T Kasaian. The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology*. Dec 1997; 92(4): 577–586.
150. Fjeldsgaard BE, Paulsen BS. Comparison of IgE-binding antigens in horse dander and a mixture of horse hair and skin scrapings. *Allergy* 1993; 48 (7): 535-41.
151. Saarelainen S, Rytkönen-Nissinen, Rouvine J, Taivanen A, Auriola S, Kauppinen A, Kinnunen, Virtanen T. Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity. *Clin and Exp Allergy* 2007; 38: 734-381.
152. Malo JL, Lemiere C, Desjardins A, Cartier A. Prevalence and intensity of rhinoconjunctivitis in subjects with occupational asthma. *Eur Respir J* 1997; 10: 1513-5.
153. Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational Asthma *Am J Resp Crit Care Med* 2005; 172: 280-305.
154. Fernández-Nieto M, Sastre B, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Madero M, Del Pozo V. Changes in sputum eicosanoids and inflammatory markers after inhalation challenges with occupational agents. *Chest* 2009; 136; 1308-15.
155. Lemiere C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7: 133-7.
156. Maniscalco M, Grieco L, Galdi A, et al. Increase in exhaled nitric oxide in shoe and leather workers at the end of the work-shift *Occup Med (Lond)* 2004; 54:404-7.
157. Sundblad BM, Larsson BM, Palmberg L, Larsson K. Exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness in healthy subjects exposed to organic dust. *Eur Respir J* 2002; 20: 426-31.

158. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax* 2003; 58: 528-32.
159. Ihre E, Gyllfors P, Gustaffson LE, Kumlin M, Dahlen B. Early rise in exhaled nitric oxide and mast cell activation in repeated low dose allergen challenge. *Eur Respir J.* 2006; 27: 1152-9.
160. Smith AD, Cowan JO, Brasset KP, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Herbison GP, Taylor DR. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 453-9.
161. Polovic N, Waden K, Binnmyr J, Hamsten C, Grönneberg R, Palmberg C, Milcic-Matic N, Bergman T, Grönlund H, van Hage M. Dog saliva: an important source of dog allergens. *Allergy.* 68, 2013 585-592.
162. Gordon S, Tee RD, Stuart MC, Newman Taylor AJ. Analysis of allergen in rat fur and saliva. *Allergy* 2001; 56: 563-567.
163. Baker J, Berry A, Boscato LM, Gordon S, Walsh BJ, Stuart MC, Identification of some rabbit allergens as lipocalins. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 303-312.
164. Virtanen T, Zeiler T, Mäntyjärvi R *et al.* Important animal allergens are lipocalin proteins: Why are they allergenic? *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 247-58.
165. Limacher A, Glaser AG, Meisler C *et al.* Cross-reactivity and 1.4-A crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin, a member of a new pan-allergen family. *J Immunol* 2007; 178: 389-96.
166. Wopfner M, Willeroidee M, Hebenstreit D *et al.* Molecular and immunological characterization of profiling from mugwort pollen. *Biol Chem* 2002; 383: 1779-89.



***ANEXOS***



## **ANEXO 1**

**“Alergia al hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*): estudio del perfil clínico de los pacientes alérgicos a este roedor e identificación de sus alérgenos”.**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

#### **INFORMACIÓN BÁSICA Y OBJETIVOS**

Usted es una persona que presenta o ha presentado síntomas de tipo alérgico (respiratorios, cutáneos, sistémicos), tras haberse expuesto al hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*).

La Alergia al hámster Siberiano ó Ruso ha ido aumentando en los últimos 2-3 años en España, debido a la introducción frecuente de este animal como mascota dentro de los hogares. Esto ha conllevado a que muchas personas presenten síntomas alérgicos por primera vez, y que también otros pacientes que ya eran alérgicos también se hayan hecho alérgicos a este animal.

El objetivo principal de este proyecto de investigación es poder estudiar en este animal, las fuentes de donde provienen los alérgenos (proteínas animales) responsables de producir los síntomas; como también lo es, estudiar estas proteínas, con la finalidad de identificarlas, para de esta forma poder abordar mejor el estudio de los pacientes, tener herramientas para el diagnóstico y un adecuado tratamiento.

Este trabajo lo va a realizar el Alergólogo José Alberto Torres Hernández, No. de colegiado 2828/57644, Ex – residente de Alergología de este hospital, bajo la supervisión del Dr. Joaquín Sastre (Jefe del Servicio de Alergología del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz-IDC) y con la colaboración del Dr. Carlos Pastor quien labora en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Sanitarias (IIS).

#### **METODOLOGÍA DEL ESTUDIO**

Si usted presenta o ha presentado síntomas alérgicos ante la exposición de hámster Siberiano y decidiera participar en el estudio, su participación consistiría únicamente en realizarse una pruebas cutáneas (las típicas pruebas de “la Alergia” en el brazo, que se realiza normalmente en la consulta de Alergia en cada revisión) con extractos comerciales de neumoaérgenos ambientales y de roedores y con extractos de hámster Siberiano y otras especies. Además necesitaríamos una extracción de su sangre, aproximadamente 60 ml, que se realizará en el laboratorio de análisis generales (1º piso). Igualmente se le realizará una espirometría y una determinación de óxido nítrico exhalado (pruebas respiratorias que habitualmente se realizan de rutina en la consulta de Alergia).

#### **RIESGOS Y BENEFICIOS**

Las pruebas cutáneas se realizarán con el debido rigor y control con el que habitualmente se hacen las pruebas rutinarias en la consulta de Alergia. Por lo que cualquier reacción local y/o sistémica que pudiera presentar tras la realización de las pruebas cutáneas, se trataría por nosotros en la consulta de Alergología, donde se tiene medicación especial para casos donde fuese necesario administrar. Este tipo de pruebas se hace con material estéril y desechable, que minimizan el riesgo de contagio con alguna enfermedad.



Las muestras de suero obtenidas se identificarán con una numeración y/o sus iniciales. Se almacenarán en una seroteca en una nevera. Se utilizarán para hacer distintas pruebas “in vitro” y por lo tanto no existe ningún riesgo de enfermedad para el paciente.

Con su participación en este estudio usted contribuirá a la investigación de este nuevo problema de salud, ayudará a mejorar el diagnóstico y hacer posible el uso de nuevos tratamientos para esta enfermedad.

## **CONFIDENCIALIDAD**

Los datos derivados de su participación en el estudio se facilitarán al promotor del estudio y solo aparecerán sus iniciales y no su nombre. Es posible que el promotor y las autoridades sanitarias, necesiten revisar su historia médica para confirmar la información recogida. Su nombre nunca aparecerá en ningún informe, salvo en el que se le entregue. Los promotores del estudio, en cumplimiento de la ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le informa que sus datos personales serán incluidos en ficheros informatizados de datos de carácter personal y titularidad de la Fundación Jiménez Díaz, responsable del tratamiento y destinataria de los datos. Puede ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición previstos en la Ley, a los promotores del estudio, en el Servicio de la Alergia de la Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid. Los promotores del estudio tienen la obligación de secreto de los datos y el deber de guardarlos, y adoptará las medidas necesarias para evitar su alteración, pérdida o acceso no autorizado. En cualquier caso, los promotores del estudio garantizan que en la utilización de sus datos personales se observarán escrupulosamente las obligaciones establecidas en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y Real decreto 994/1999, de 11 de junio, por el que se aprueba el reglamento de medidas de seguridad de los ficheros automatizados que contengan datos de carácter personal, así como en el restante ordenamiento aplicable donde se establecen garantías y cautelas en cuanto al tratamiento de los datos de carácter personal.

## **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Su participación en este estudio es **voluntaria** y puede consultarla con otras personas, (familiares, amigos, médico de familia, etc.) antes de otorgar su consentimiento. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

## **DECLARACIÓN DEL PACIENTE**

Otorgo voluntariamente mi consentimiento a participar en este estudio. He leído y comprendido este documento de consentimiento informado y los riesgos que en él se describen. Comprendo que puedo retirar mi consentimiento o retirarme de este estudio en cualquier momento sin pérdida alguna de los beneficios a los que tengo derecho.

---

**Firma del paciente**

---

**Firma del investigador**

En Madrid a \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

**“Alergia al hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*): estudio del perfil clínico de los pacientes alérgicos a este roedor e identificación de sus alérgenos”.**

### **Cuestionario clínico-epidemiológico**

**Nombre:**

**Edad:**

**Sexo:**

**Fumador:**

**Número de hámsteres en el domicilio:**

**Localización de los hámsteres en el domicilio:**

**¿Cuándo comenzaron los síntomas? (tiempo de latencia, semanas)**

**¿Qué síntomas ha tenido?**

**¿Ha tenido exposición previa a otros animales? A cuáles?**

**¿Ha tenido síntomas alérgicos por exposición previa a otros animales? A cuáles?**

**¿Es alérgico al polen?**

**¿Qué tratamiento ha estado recibiendo o recibido durante la exposición y presencia de síntomas alérgicos?**

### **PRUEBAS COMPLEMENTARIAS**

**1.- Analíticas (CAP animales y proteínas recombinantes de perro, gato y caballo)**

**2.- Pruebas en el momento de la inclusión en el estudio:**

**Determinación de FeNO:**

**Espirometría basal: CVF:**

**VEF<sub>1</sub>:**

**VEF<sub>1</sub>/CVF:**

**3.- Pruebas cutáneas (neumoalérgenos comunes, mm):**

**Pruebas cutáneas (hámsteres, mm):**

hámster Siberiano:	pelo:	saliva:	orina:
hámster común o Europeo:	pelo:	saliva:	orina:
hámster dorado:	pelo:	saliva:	orina:
hámster Roborowski:	pelo:	saliva:	orina:

**Pruebas a los 6 meses (revisión) de la inclusión en el estudio:**

**Determinación de FeNO:**

Espirometría basal: CVF:      VEF<sub>1</sub>:      VEF<sub>1</sub>/CVF:

**2.- Pruebas cutáneas (neumoalérgenos comunes, mm):**

**3.- Pruebas cutáneas (hámsteres, mm):**

hámster Siberiano:	pelo:	saliva:	orina:
hámster común o Europeo:	pelo:	saliva:	orina:
hámster dorado:	pelo:	saliva:	orina:
hámster Roborowski:	pelo:	saliva:	orina:

¿Qué tiempo ha pasado desde qué ha retirado el (los) hámster (es) y ha notado mejoría clínica? (tiempo de mejoría, semanas)

¿Recibió atención alguna vez en Urgencias por síntomas relacionados con su Alergia al hámster Siberiano? ¿Qué tratamiento recibió?

## ANEXO 3

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS DE PROVOCACIÓN NASAL ESPECÍFICA CON ALÉRGENO

#### INFORMACIÓN

##### ¿QUÉ ES Y CÓMO SE REALIZA?[Identificación y descripción del procedimiento]

Consiste en la aplicación del agente sospechoso en las fosas nasales mediante un spray o aplicación directa. Se administrarán dosis progresivamente crecientes, bajo vigilancia médica, observando la función nasal.

##### ¿PARA QUÉ SIRVE?[Objetivos del procedimiento y beneficios que se esperan de él]

La prueba de provocación nasal específica es necesaria para determinar con la mayor exactitud posible la causa de la rinitis.

##### ¿QUÉ CONSECUENCIAS IMPORTANTES PRODUCIRÁ LA INTERVENCIÓN?

Este procedimiento puede durar entre 30 minutos y 2 horas. Puede producir una rinitis (estornudos, agüilla, obstrucción nasal, picor)

##### ¿QUÉ RIESGOS PUEDE HABER?[Conforme a la experiencia y al estado actual de la ciencia, o en relación directa con este tipo de intervención]

###### Riesgos frecuentes

Esta prueba conlleva escaso riesgo, pudiendo aparecer crisis de rinitis (estornudos, agüilla, obstrucción nasal, picor) de intensidad variable, rara vez graves.

###### Riesgos poco frecuentes

Además de una rinitis pueden muy ocasionalmente producir una reacción asmática (sensación de falta de aire o ruidos en el pecho) casi siempre leve, aunque puede requerir tratamiento con broncodilatadores.

###### Riesgos específicamente relacionados con el paciente

##### ¿HAY OTRAS ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO?

Es la técnica más específica para demostrar la relación entre la rinitis y una sustancia. No hay alternativa en su caso.

##### ¿QUÉ CONSECUENCIAS SON PREVISIBLES DE LA NO REALIZACIÓN?

No se podría determinar con exactitud la causa de su rinitis.

## DECLARACIONES Y FIRMAS

### PACIENTE

D./ D<sup>a</sup>.....con DNI.....declaro que el/la médico, Dr/Dra. ...., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención.

También me ha explicado los riesgos existentes, las posibles molestias o complicaciones, que éste es el procedimiento más adecuado para mi situación clínica actual, y las consecuencias previsibles de su no realización.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, y **doy mi consentimiento** para que me realicen dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento.

Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En ..... a ..... de ..... De 20....

Firmado...el/la paciente

### REPRESENTANTE LEGAL

D. / D<sup>a</sup>.....con DNI..... y domicilio en .....calle .....nº..... declaro que el/la médico, Dr/Dra....., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención.

También me ha explicado los riesgos existentes, las posibles molestias o complicaciones, que éste es el procedimiento más adecuado para la situación clínica actual del paciente y las consecuencias previsibles de su no realización.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas y **doy mi consentimiento** para que realicen al paciente D./D<sup>a</sup>.....con DNI....., dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento.

En ..... a ..... de ..... De 20....

Firmado... el/la representante

### MÉDICO

Dr/Dra.....

He informado a este/a paciente, y/o a su representante legal, del propósito y naturaleza del procedimiento descrito, de sus posibles riesgos, de las alternativas disponibles, y de las consecuencias previsibles en caso de no realización, dejando constancia de ello en la historia clínica. Asimismo, se le preguntó sobre posibles alergias, la existencia de otras enfermedades o cualquier otra circunstancia patológica personal que pudiera afectar o condicionar la realización de este procedimiento/acto asistencial. Se incorpora este documento a la historia clínica del paciente.

En..... a ..... de ..... De 20....

Firma, nº de colegiado

### NEGATIVA DEL PACIENTE A LA REALIZACIÓN ☐

Si usted no acepta la realización de la exploración/intervención haga constar el motivo:  
.....

### REVOCACIÓN DE LA DECISIÓN POR EL PACIENTE ☐

En..... a ..... de ..... De 20....

Firmas: (Paciente) El/la médico Dr..... Colegiado

## ANEXO 4

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL INHALATIVA ESPECÍFICA

#### INFORMACIÓN

##### ¿QUÉ ES Y CÓMO SE REALIZA?[Identificación y descripción del procedimiento]

Consiste en la aplicación del agente sospechoso al aparato respiratorio mediante inhalación de partículas en aerosol, polvo o vapores. Se administran dosis progresivamente crecientes, bajo vigilancia médica, observando la función pulmonar.

##### ¿PARA QUÉ SIRVE?[Objetivos del procedimiento y beneficios que se esperan de él]

La prueba de provocación inhalativa bronquial específica es necesaria para determinar con la mayor exactitud la posible causa del asma.

##### ¿QUÉ CONSECUENCIAS IMPORTANTES PRODUCIRÁ LA INTERVENCIÓN?

La técnica puede requerir varias horas de observación y puede producir una crisis de asma.

##### ¿QUÉ RIESGOS PUEDE HABER?[Conforme a la experiencia y al estado actual de la ciencia, o en relación directa con este tipo de intervención]

###### Riesgos frecuentes

Esta prueba conlleva escaso riesgo, pudiendo aparecer crisis de asma de intensidad variable, rara vez graves.

###### Riesgos poco frecuentes

Puede producir una reacción asmática intensa que requiera tratamiento con broncodilatadores.

###### Riesgos específicamente relacionados con el paciente

##### ¿HAY OTRAS ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO?

Esta prueba es la más específica para demostrar la relación entre el asma y una sustancia y en su caso no hay otras alternativas médicas para poder mostrar esa relación.

##### ¿QUÉ CONSECUENCIAS SON PREVISIBLES DE LA NO REALIZACIÓN?

Sería más difícil el diagnóstico preciso de la causa de su asma

## DECLARACIONES Y FIRMAS

### PACIENTE

D./ D<sup>a</sup>.....con DNI.....declaro que el/la médico, Dr/Dra. ...., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención.

También me ha explicado los riesgos existentes, las posibles molestias o complicaciones, que éste es el procedimiento más adecuado para mi situación clínica actual, y las consecuencias previsibles de su no realización.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, y **doy mi consentimiento** para que me realicen dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento.

Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En ..... a ..... de ..... De 20....

Firmado...el/la paciente

### REPRESENTANTE LEGAL

D. / D<sup>a</sup>.....con DNI..... y domicilio en .....calle .....nº..... declaro que el/la médico, Dr/Dra....., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención.

También me ha explicado los riesgos existentes, las posibles molestias o complicaciones, que éste es el procedimiento más adecuado para la situación clínica actual del paciente y las consecuencias previsibles de su no realización.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas y **doy mi consentimiento** para que realicen al paciente D./D<sup>a</sup>.....con DNI....., dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento.

En ..... a ..... de ..... De 20....

Firmado... el/la representante

### MÉDICO

Dr/Dra.....

He informado a este/a paciente, y/o a su representante legal, del propósito y naturaleza del procedimiento descrito, de sus posibles riesgos, de las alternativas disponibles, y de las consecuencias previsibles en caso de no realización, dejando constancia de ello en la historia clínica. Asimismo, se le preguntó sobre posibles alergias, la existencia de otras enfermedades o cualquier otra circunstancia patológica personal que pudiera afectar o condicionar la realización de este procedimiento/acto asistencial. Se incorpora este documento a la historia clínica del paciente.

En..... a ..... de ..... De 20....

Firma, nº de colegiado

### NEGATIVA DEL PACIENTE A LA REALIZACIÓN ☐

Si usted no acepta la realización de la exploración/intervención haga constar el motivo:  
.....

### REVOCACIÓN DE LA DECISIÓN POR EL PACIENTE ☐

En..... a ..... de ..... De 20....

Firmas: (Paciente) El/la médico Dr..... Colegiado

## ANEXO 5

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS DE EXPOSICIÓN CONTROLADA EN CÁMARA DE PROVOCACIÓN

#### INFORMACIÓN

##### ¿QUÉ ES Y CÓMO SE REALIZA? [Identificación y descripción del procedimiento]

Consiste en la exposición al agente sospechoso en las mismas condiciones que se producen en su hogar y/o área de trabajo. Se coloca al paciente dentro de la cámara de provocación junto a una jaula que contiene dentro 4 hámsteres Siberianos y bajo vigilancia médica se observa la aparición de síntomas..

##### ¿PARA QUÉ SIRVE? [Objetivos del procedimiento y beneficios que se esperan de él]

La prueba de exposición controlada es necesaria para confirmar que los síntomas se reproducen tal cual estuviera en su hogar y/o área de trabajo.

##### ¿QUÉ CONSECUENCIAS IMPORTANTES PRODUCIRÁ LA INTERVENCIÓN?

La técnica puede requerir desde minutos hasta varias horas de observación y puede producir síntomas que pueden ir desde rinoconjuntivitis hasta una crisis de asma.

##### ¿QUÉ RIESGOS PUEDE HABER? [Conforme a la experiencia y al estado actual de la ciencia, o en relación directa con este tipo de intervención]

###### Riesgos frecuentes

Esta prueba conlleva escaso riesgo, pudiendo aparecer desde una rinoconjuntivitis leve hasta una crisis de asma de intensidad variable, rara vez graves.

###### Riesgos poco frecuentes

Puede producir una reacción asmática intensa que requiera tratamiento con broncodilatadores.

###### Riesgos específicamente relacionados con el paciente

##### ¿HAY OTRAS ALTERNATIVAS AL PROCEDIMIENTO?

Esta prueba es la más específica para demostrar que sus síntomas están en relación con la exposición a los hámsteres Siberianos y en su caso no hay otras alternativas médicas para poder mostrar esa relación.

##### ¿QUÉ CONSECUENCIAS SON PREVISIBLES DE LA NO REALIZACIÓN?

Sería más difícil el diagnóstico preciso de la causa de sus síntomas.





## DECLARACIONES Y FIRMAS

### PACIENTE

D./ D<sup>a</sup>.....con DNI.....declaro que el/la médico, Dr/Dra. ...., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención.

También me ha explicado los riesgos existentes, las posibles molestias o complicaciones, que éste es el procedimiento más adecuado para mi situación clínica actual, y las consecuencias previsibles de su no realización.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, y **doy mi consentimiento** para que me realicen dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento.

Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En ..... a ..... de ..... De 20....

Firmado...el/la paciente

### REPRESENTANTE LEGAL

D. / D<sup>a</sup>.....con DNI..... y domicilio en .....calle .....nº..... declaro que el/la médico, Dr/Dra....., me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención.

También me ha explicado los riesgos existentes, las posibles molestias o complicaciones, que éste es el procedimiento más adecuado para la situación clínica actual del paciente y las consecuencias previsibles de su no realización.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas y **doy mi consentimiento** para que realicen al paciente D./D<sup>a</sup>.....con DNI....., dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento.

En ..... a ..... de ..... De 20....

Firmado... el/la representante

### MÉDICO

Dr/Dra.....

He informado a este/a paciente, y/o a su representante legal, del propósito y naturaleza del procedimiento descrito, de sus posibles riesgos, de las alternativas disponibles, y de las consecuencias previsibles en caso de no realización, dejando constancia de ello en la historia clínica. Asimismo, se le preguntó sobre posibles alergias, la existencia de otras enfermedades o cualquier otra circunstancia patológica personal que pudiera afectar o condicionar la realización de este procedimiento/acto asistencial. Se incorpora este documento a la historia clínica del paciente.

En..... a ..... de ..... De 20....

Firma, nº de colegiado

### NEGATIVA DEL PACIENTE A LA REALIZACIÓN ☐

Si usted no acepta la realización de la exploración/intervención haga constar el motivo:  
.....

### REVOCACIÓN DE LA DECISIÓN POR EL PACIENTE ☐

En..... a ..... de ..... De 20....

Firmas: (Paciente) El/la médico Dr..... Colegiado